

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機序の解明とその対策に関する精神神経免疫学的研究

主任研究者 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

高齢者の精神機能老化の機序を解明する目的で、老化に伴うナチュラルキラー細胞の変化の検討、アポトーシスに関与するリン酸化酵素の老化に伴う変化、小胞体ストレスの変化、老年期の感情障害に及ぼす潜在性脳梗塞の影響にテーマを絞り、精神神経免疫学的立場から検討を加えた。これらの研究から、老年者に認められる認知障害と感情障害の発生機序の生物学的基盤の一端があきらかとなった。引き続きこのような検討を進めることで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: 老化、ナチュラルキラー細胞、アポトーシス、アルツハイマー病、潜在性脳梗塞

**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)

**A. 研究目的**

高度な高齢化社会を迎え、老年期精神障害に対する対策はその有病率の高さから、社会的急務といえる。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められている。しかし、脳の老化過程により精神機能が低下すると考えられているものの、その機序につ

いては今なお断片的な知見しかない。従って、老年者にみられる認知障害や感情障害の機序を生物学的基盤をもって検討することは重要である。本研究は、高齢者の精神機能老化について精神神経免疫学的に様々な角度から検討し、予防策を開発することを目的とした。

**B. 研究方法**

この研究課題は、臨床的な老年期痴呆の症候学蓄積と近年発展のめざましい精神神経免疫学が合わさって初めて可能になると考えられる。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に知見が得られるようにした。

新井は、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、リンパ球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、年齢との相関性を調べた。神庭は、老齢ラットを用いて、アポトーシスに抑制的に働くことが想定される活性化型プロテインキナーゼ B / A k t ( p A k t ) が老化によって変化しているかどうかを免疫組織科学的方法で検討した。山脇は、老年期うつ病患者において、その病態や治療経過に対して SCI の影響を明らかにするために 50 歳以上のうつ病患者を対象として、抗うつ薬に対する治療反応性、維持療法継続中の認知機能を SCI の有無により比較、精神免疫学的指標についてはうつ病患者において病相期と寛解期を比較・検討した。武田は、家族性アルツハイマー病の原因遺伝子プレセニリン 1 の変異と小胞体ストレスセンサー分子の IRE1 の活性化について検討した。

### C. 研究結果

#### (1) 老化および精神機能と免疫能の相関(新井)

ナチュラルキラー(NK)細胞数(NK細胞すべてのサブセット)は年齢と正の相関が見られた。NK細胞のなかでも最も活性高いサブセット(CD16+56+3-)も年齢との相関性がみられた。またその他のサブセットでは年齢との正の相関がみられたが、CD16-56+3-では負の相関が見られた。IFN- $\gamma$ 産生能は年齢と正の相関がみられた。IL-1 $\beta$ は年齢との負の相関がみられた。IL-4年齢と正の相関がみられ、これには性差がみられ、男性に有意に高値を示した。

NK細胞活性の平均値は女性に比して男性の方が高値を示し、統計学的(二標本t検定)に有意差が認められた。リンパ球サブセットでは、[CD3-, CD16-, CD56+]細胞において男性が女性よりも有意な高値を示したが、その他の細胞については有意差がなく、NK細胞

数にも有意差は認められなかった。NK細胞活性を高値群、中間群、低値群の3群に分類し、この3群とリンパ球サブセットの比率を比較したところ、NK細胞数はNK細胞活性高値群が低値群より統計学的有意差を持って多かった。NK細胞活性値の高値群、中間群、低値群の3群において、SDS、CMIとの関連性を検討した。高値群のSDSの値は低値群のそれより統計学的有意差をもって低かった。またCMIのphysical complaintsについては3群間に有意差はなかったが、mental complaintsは高値群に比べ、低値群が高値を示し、統計学的有意差が認められた。サイトカイン産生能あるいはIL-2は、いずれも心理検査およびNK細胞活性との有意な相関性は認められなかったが、NK細胞活性が低下するに従って高濃度になる傾向が伺われた。

#### (2) 老化におけるラット海馬の活性化型プロテインキナーゼ B/Akt 発現の変化(神庭)

アポトーシスに抑制的に働くことが想定される活性化型プロテインキナーゼ B / A k t ( p A k t ) が老化によって変化しているかどうかを免疫組織科学的方法で検討した。p A k t の免疫活性をもつ A k t 陽性細胞はラットの CA1 領域で、対照の若令ラット(8週令)と比較して多かった。この p A k t 陽性細胞の増加が、リン酸化の障害であるのか、それとも A k t の発現自体が変化しているのか検討するために A k t を同様に免疫組織化学的方法で検討した。A k t 自体が CA1 領域で若令群と比較して増加していたことから、p A k t 陽性細胞の差は A k t 発現の差によって生じている可能性が考えられた。老齢ラットにおけるアポトーシス細胞(TUNEL陽性細胞)の差を検討したところ、CA1領域では、DA領域で認められる TUNEL 陽

性細胞数の変化は検出されなかった。これらのことから CA 1 領域の p A k t が、同領域のアポトーシスの老化による増加を抑制している可能性を示唆した。

### (3) 変異プレセニリン 1 がもたらす小胞体ストレス脆弱性 (武田)

アルツハイマー病は老化の究極像と考えられている。家族性アルツハイマー病の原因遺伝子であるプレセニリン 1 (PS1) と小胞体ストレス (ER stress) の関係について検討した。変異型 PS1 は IRE1 は、ER stress に対する脆弱性を惹起し、それは分子シャペロンである GRP78 の誘導を抑制するためであることが示されている。ER stress が掛かると ER 内に unfolded protein が蓄積するが、IRE1 はそれを感じ、自己リン酸化を受けダイマー化することでシグナルを下流に伝え、GRP78 は発現する。そこで、変異型 PS1 がこのリン酸化に及ぼす影響について検討した。変異型 PS1 を発現させた HEK293T 細胞では IRE1 の <sup>32</sup>P 取り込みが野生型細胞より悪く、ΔE9 発現細胞のリン酸化はもっとも抑制されていた。他のリン酸化を受ける分子即ち Tau や GSK-3β について検討したが、PS1 遺伝子型による差異は認められなかった。従って変異型 PS1 は IRE1 のリン酸化を選択的に抑制し、UPR を抑制することが示唆された。

### (4) 潜在性脳梗塞と認知・感情障害に関する研究 (山脇)

老年期うつ病患者において、その病態や治療経過に対して潜在性脳梗塞 (SCI) の影響を明らかにするために 50 歳以上のうつ病患者を対象として以下について検討した。

1) 抗うつ薬に対する治療反応性：ハミルトンうつ病評価尺度 (HRSD) の改善率によって評価した。抗うつ薬の処方量は SCI を伴う群、伴わない群ともに差はなかった。SCI を

伴う群では入院後 2 週間、退院時とも HRSD の改善は SCI を伴わない群と比較して有意に低値であり、入院期間も有意に長期であった。

2) 維持療法継続中の認知機能：WAIS-R、内田-クレペリン精神作業検査を用いて評価した。評価時の HRSD は両群とも差がなかったが、SCI を伴う群では伴わない群と比較して全般性の認知機能の低下が認められた。

3) 精神免疫学的指標の検討：うつ病患者において病相期と寛解期を比較して G-s alpha subunit の減少、DNA repair protein の増加、マクロファージ遊走阻止因子関連カルシウム結合蛋白の増加が認められた。

今後、老年期うつ病において、その病態や治療経過に対して SCI の影響をさらに検討することは、老年患者のクオリティー・オブ・ライフの向上につながるものと考えられる。

## D. 考察

神経細胞内の情報伝達系に関するセカンドメッセンジャー、蛋白のリン酸化・脱リン酸化、核内転写調節因子などとともに各種ストレス蛋白の動態は精神機能の老化過程の生物学的基盤として重要な要素と考えられる。また、近年神経細胞と免疫細胞とのクロストークが明らかにされ、神経ペプチドやサイトカインを介してお互いが調節を受けているとされ、これらも老化と密接に絡む問題と考えられている。本研究では、このような背景をふまえて、脳の老化過程における生物学的基盤を明らかにし、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しようとした。

まず、加齢変化による免疫系の NK 活性について検討した。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- $\gamma$ であるが、今回の結果ではIFN- $\gamma$ 産生能の増加がみられた。しかしIFN- $\gamma$ 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。今回我々はNK細胞活性の強度とリンパ球数の相関性、また心理検査との関連性を検

討するために、NK細胞活性を3群に分けたところ、NK細胞数は高値群の方が多く、低値群は高値群に比べ、SDSが高かった。CMIではphysical complaintsには有意差はなく、mental complaintsが高かった。上記の結果より、NK細胞活性は情動変化がその低下に関与している可能性が示唆された。またNK細胞数もNK細胞活性と相関していることから、情動変化は活性のみならず細胞数にも影響を与えている可能性が推測された。サイトカイン産生能についての結果ではNK細胞活性が低下するに従い、IFN- $\gamma$ およびIL-2の産生能は上昇する傾向が見られた。前述の通り、IFN- $\gamma$ やIL-2はNK細胞活性に促進的に働くためこの結果は矛盾がないものと思われる。

アポトーシスに関与するリン酸化酵素の老化に伴う変化についても検討した。老令(75週令)および若例(7週令)ラットを用いた検討からは、海馬における活性型Akt陽性細胞は、海馬CA1領域において有意にその数が増加していた。更に我々は、この差がAktの産生、または上述したリン酸化過程のいずれの差であるのか検討するために、活性化されていないAkt陽性細胞数を同じラットの標本を用いて検討したが、この結果、すでにAktの段階で、海馬のCA1領域で陽性細胞が増加していることが明らかとなった。以上のことから、ラット海馬CA1領域の活性型Akt陽性細胞の増加には、このキナーゼの産生の増加が関与していることが考えられた。しかし、染色切片上で活性型でないAktは、明らかに活性型のものより多く、この活性化に関係するリン酸化過程も影響していることが推察された。老令ラットにおけるアポトーシス細胞(TUNEL陽性細胞)の差を検討し

たところ、CA1 領域では、DA 領域で認められる TUNEL 陽性細胞数の変化は検出されなかった。このことから CA 1 領域の p A k t が、同領域のアポトーシスの老化による増加を抑制している可能性が考えられた。これらの結果は、老化による神経細胞死の制御の過程に Akt が関与していることを示すものと考えられ、老化による精神機能低下の機序を解明するために重要と考えられた。

更に小胞体ストレスとアルツハイマー病原因遺伝子との関係について検討した。アルツハイマー病は老化の究極像と考えられるため検討した。ER stress に伴い、unfolded protein response(UPR)が生じることが知られているが、UPR は ER 膜上にある IRE1 によって unfolded protein が ER 内に蓄積していることを感知することから始まる。IRE1 は自己リン酸化を受け、ダイマーを形成し、シグナルを下流に伝達し、GRP78を誘導する。GRP78はunfolded protein に働きかけ、foldingを是正するとされている。今回我々の結果は、変異型 PS1 がこの IRE1 のリン酸化を抑制して、UPR をダウンレギュレーションし、それが細胞の脆弱性をもたらすことを示唆している。酵母では IRE1 のリン酸化の制御は serine/threonine phosphatase Ptc2 によるとされている。従って、変異型 PS1 は IRE1 と Ptc2 の関連に関与することで、IRE1 のリン酸化に影響をあたえるものと理解される。今回の結果では、PS1 が IRE1 に結合することが示され、この結合の度合いは野生型と変異型間で差がなかった。野生型 PS1 の UPR に対する影響については PS1 のノックアウト細胞を用いての検討を待たねばならないが、今回の結果は、変異型 PS1 が gain of function 的に IRE1 のリン酸化を抑制することが示唆される。

最後に、老年期の感情障害に及ぼす潜在性

脳梗塞の影響について検討した。潜在性脳梗塞を伴ううつ病の抗うつ薬に対する治療反応性については、われわれの報告も含めてこれまでにもいくつかなされている。それらの報告ではせん妄などの中枢神経系の副作用の出現の頻度が高いことや、入院治療における寛解率の低さなどを指摘しているが、薬物治療の内容の比較がされていない。今回のわれわれの検討の結果も治療反応性についてはこれまでの報告の結果を支持するものであるが、抗うつ薬・抗不安薬・睡眠薬などの薬物治療の種類および処方量が SCI を伴う群と伴わない群の間で有意な差はなかったことから、治療反応性の差は薬物療法の差に起因するものではなく、SCI の存在に起因するものであると考えられた。今後、潜在性脳梗塞がどのような機序を介して治療反応性に対して影響を与えるかを更に検討していく必要があると考えられた。うつ病相寛解後の維持療法期間中の認知機能の検討では SCI を伴う群では SCI を伴わない群と比較して全般性の認知機能の低下が認められた。上述の抗うつ薬に対する治療反応性の違いも含めて、老年期うつ病患者の早期発見や治療法、うつ病寛解後の日常生活に対する援助の方法を考えていく上で示唆に富む点であると考えられた。高齢者うつ病患者の精神免疫学的指標の今回の検討結果は少数例での検討であり、この結果から何らかの結論を導き出すことはできないが、うつ病と免疫機能低下との関連性を考えていく上で、多種類の既知の遺伝子発現を一回のハイブリダイゼーションによって同時に検討することができる Micro array 法を用いることは各遺伝子の変化のみならず各遺伝子間の相互作用についても明らかにすることができる。と期待され、高齢者の精神機能老化機序の解

明に対して新たな精神神経免疫学的研究法の可能性が示唆された。

## 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) NK 細胞活性は年齢との相関性は無かったが、NK 細胞数は活性の高いサブセットを中心に年齢と正の相関性が見られた。また NK 細胞活性は精神状態に影響を受ける可能性が示唆された。

(2) 老齢ラットにみられる p A k t 陽性細胞の増加が、リン酸化の障害というよりむしろ A k t 発現の差によって生じている可能性を示唆した。また、CA 1 領域の p A k t が、同領域のアポトーシスの老化による増加を抑制している可能性を示唆した。

(3) 変異型の PS1 は、ER stress センサー分子である IRE1 の自己リン酸化を抑制し、ER stress 下での GRP78 発現を低下させ、神経細胞の脆弱性を上昇させることが示唆された。

(4) 老年期うつ病の患者の中で、脳梗塞を基盤とする患者の特徴のいくつかは、明となったことで老年期うつ病の患者を SCI を中心としてサブグループに分けることができる。

## F. 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) N. Shibata, T. Ohnuma, H. Arai et al.: Genetic association between alpha-2 macroglobulin and Japanese sporadic Alzheimer's disease. Neuroscience Letters 271 (1999) 132-134

(3) M. Kimura, T. Asada, H. Arai et al.: Assessment of cerebrospinal fluid levels of serum amyloid P component in patients with Alzheimer's disease. Neuroscience Letters 273

(1999) 137-139

(4) Katayama T, Imaizumi K, Sato N, Miyoshi K, Kudo T, Hitomi J, Morihara T, Yoneda T, Gomi F, Mori Y, Nakano Y, Takeda J, Tsuda T, Itoyama Y, Murayama O, Takashima A, St George-Hyslop P, Takeda M, Tohyama M. Presenilin-1 mutations downregulate the signalling pathway of the unfolded-protein response. Nat Cell Biol. 1999 Dec;1(8):479-485.

(5) Tanimukai H, Tsujio I, Hashimoto R, Kudo T, Kamino K, Shinozaki K, Takeda M. Presenilin-2 mutation and polymorphism in Japanese Alzheimer disease patients. Clin Chim Acta. 1999 May;283(1-2):57-61.

(6) Nakano Y, Kondoh G, Kudo T, Imaizumi K, Kato M, Miyazaki JI, Tohyama M, Takeda J, Takeda M. Accumulation of murine amyloid beta42 in a gene-dosage-dependent manner in PS1 'knock-in' mice. Eur J Neurosci. 1999 Jul;11(7):2577-81.

(7) Tanimukai H, Sato K, Kudo T, Kashiwagi Y, Tohyama M, Takeda M. Regional distribution of presenilin-1 messenger RNA in the embryonic rat brain: comparison with beta-amyloid precursor protein messenger RNA localization. Neuroscience. 1999 Apr;90(1):27-39.

(8) Takebayashi, M., Kagaya, A., Inagaki, M., Kozuru, T., Jitsuiki, H., Kurata, K., Okamoto, Y. and Yamawaki, S.: Effects of antidepressants on  $\gamma$ -aminobutyric acid- and N-methyl-D-aspartate-induced intracellular  $Ca^{2+}$  concentration increases in primary cultured rat cortical neurons. Neuropsychobiology (in press).

(9) 堀口淳, 佐伯俊成, 山脇成人: うつ病専門外来について うつ病の診断と治療: 真興交易⑭医書出版部 (東京), 134-142, 1999.

(10)藤川徳美、山脇成人：潜在性脳梗塞とうつ病 -Vascular depression の概念- 臨床精神医学 28 巻 141-149, 1999

(11)柳井一郎、山脇成人：抑うつ状態と無症候性脳梗塞 Clinical Pharmacotherapy5：214-219,1999

(12)山脇成人：潜在性脳梗塞とうつ病の関連について 老年期痴呆研究会誌 11：145-148,1999

(13)山脇成人：潜在性脳梗塞と抑うつ症状 Geriatric Medicine37：1329-1333,1999

## 2. 学会発表

(1)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.

(2)T. Ishizuka, H. Baba, Y. Nozaki, I. Takagi, M. Tsuji, K. Eto, Y. Ichimiya, H. Arai; Natural Killer Cell Activity in Relation to Mental Condition in Healthy Adults, The 9th Scientific Meeting of the Pacific Rim of The Psychiatrists, 1999.

(3)T.Kudo, K.Imaizumi, Y.Nakano, H.Tanimukai, T.Katayama, N.Sato, T.Morihara, M.Tohyama, J.Takeda, M.Takeda. Impairment of Response to ER Stress in Presenilin Mutant. International Symposium on Dementia, Kobe Int'l Conference Center, 9/11/99.

(4)T.Kudo, K.Imaizumi, Y.Nakano, H.Tanimukai, T.Katayama, N.Sato, T.Morihara, M.Tohyama, J.Takeda, M.Takeda. Impairment of response to ER stress in presenilin 1 knock-in mice. Annual Meeting, Society for Neuroscience, Miami, 10/26/99.

(5)山下英尚、堀口 淳、山脇成人、藤川徳美： MRI-defined Vascular Depression 患者

における認知機能の評価

第 14 回日本老年精神医学会、平成 11 年 6 月、東京

## 変異プレセニリン1がもたらす小胞体ストレス脆弱性について

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）

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）

今泉和則（大阪大学大学院医学系研究科情報伝達医学機能形態学講座）

片山泰一（大阪大学大学院医学系研究科情報伝達医学機能形態学講座）

老化は様々なストレスに対する脆弱性をもたらすと考えられる。アルツハイマー病（AD）は神経老化の究極像と考えられ、ADとストレスの関係は老化を考える上で、多大なヒントを与えてくれる。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。変異型 PS1 は A $\beta$ 42 の産生を亢進させ、様々なアポトーシス刺激に対して脆弱性を高めることが示させているが、その詳細なメカニズムは不明である。PS1 は主に局在するとされる小胞体(ER)には、種々の ER stress に対し、unfolded-protein response (UPR)があり、細胞の生存に関わるとされている。我々は、変異型 PS1 の UPR に対する影響について検討している。変異型 PS1 は UPR のひとつである分子シャペロン GRP78 発現誘導の抑制をもたらし、それが細胞の脆弱性上昇につながることを昨年度報告した。本年度は、GRP78 誘導をもたらす ER センサー分子である IRE1 の活性化に対する変異型 PS1 の影響について検討した。免疫沈降法や免疫染色法により PS1 と IRE1 は共存する事が確認された。また、UPR の過程で IRE1 はリン酸化を受けるが、変異型 PS1 はこのリン酸化を抑制することが示された。従って、変異型 PS1 は IRE1 のリン酸化を抑制することにより、UPR を抑制し、これが神経細胞死につながることを示された

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。ADのうち家族集積性が認められる家族性アルツハイマー病(FAD)が少数ながらあり、その原因遺伝子としてプレセニリン1(PS1)同定さ

れ、この分子は主に小胞体(ER)に局在するとされている。

ERはストレスに対する反応が近年研究され、種々の ER stress に対する unfolded-protein response (UPR)が報告されている。UPRは分子シャペロン GRP78 の発現誘導をもたらし、ストレスからの離脱をはかるとされている。昨年度我々は、変異型 PS1 発現細胞に ER stress を与えた場合、GRP78 の発現誘導が抑制され、それが



脆弱性をもたらすことを示した。今年度は、UPRの端緒となる IRE1 という ER センサー分子と PS1 の関係について検討し、変異型 PS1 がもたらす神経細胞脆弱性のメカニズムについて考察した。

## B. 研究方式

### IRE1 及び PS1 発現細胞の作成

SK-N-SH 細胞にリポフェクション法を用いて FLAG でタグした野生型 IRE1 及びキナーゼドメインを欠落させた  $\Delta$ IRE を導入し、ネオマイシンによるセレクションをかけて、それぞれの発現細胞株を作成した。同様の方法で野生型、A246E、 $\Delta$ E9 PS1 を SK-N-SH 細胞に導入し、発現細胞株を作成した。

### PS1 と IRE1 の局在の検討

上記の発現細胞を酢酸エタノール固定し、抗 PS1 抗体、抗 FLAG 抗体、抗 KDEL 抗体 (GRP78 を染色)、抗 p-58 抗体 (ゴルジのマーカ) で免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

また、SK-N-SH 細胞を NP-40 ライシスバッファ (1% NP-40, 10mM Tris-HCl, pH7.8, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM PMSF, 10 $\mu$ g/ml aprotinin) でライシスし、抗 FLAG 抗体及び抗 PS1 抗体で免疫沈降し、Western blotting でバインディングを確認した。

### ER stress に伴う IRE1 のリン酸化の検討

HEK293T に野生型及び変異型 PS1 と IRE1-FLAG を遺伝子導入し、<sup>32</sup>P でラベルした後、抗 FLAG 抗体で免疫沈降し、オートラジオグラフィーで IRE1 のリン酸化を検討した。

## C. 研究結果

### PS1 と IRE1 の結合

IRE1-FLAG 発現 SK-N-SH 細胞を用いて PS1 と IRE1 の局在を検討した。PS1 はこれまでの報告のように ER 及びゴルジに局在していることが

確認された。IRE1 も GRP78 との共染色により、ER に局在していることが確認された。PS1 と IRE1 の共染色で、この2分子が ER 膜上で局在が一致していることが認められた。

PS1 と IRE1 の結合について免疫沈降法を用いて検討した。IRE1-FLAG 発現のライセートを抗 FLAG 抗体で免疫沈降し、抗 PS1 抗体を用いた Western blotting で検討したところ、PS1 全長が染め出された。一方、ライセートを PS1 の抗体で免疫沈降し、抗 FLAG 抗体で Western blotting すると、IRE1 が染色された。これらのことより、IRE1 は PS1 の全長型と結合していることが示唆された。野生型、A246E、 $\Delta$ E9 PS1 発現 SK-N-SH 細胞をそれぞれ抗 PS1 抗体で免疫沈降し、抗 IRE1 抗体で Western blotting すると、それぞれ IRE1 が染色され、PS1 の遺伝子変異間で IRE1-PS1 の結合に差異はないことが確認された。ER の膜上に存在する Bcl-x との結合について同様に検討したが、IRE1 と Bcl-x の結合は確認されず、IRE1 と PS1 の結合は特異的であることが示唆された。

### IRE1 のリン酸化の検討

IRE1 は、ER 内に unfolded protein が蓄積するとそれを感じ、自己リン酸化を受けダイマー化することでシグナルを下流に伝える。そこで、変異型 PS1 がこのリン酸化に及ぼす影響について検討した。変異型 PS1 を発現させた HEK293T 細胞では IRE1 の <sup>32</sup>P 取り込みが野生型細胞より悪く、 $\Delta$ E9 発現細胞のリン酸化はもつとも抑制されていた。他のリン酸化を受ける分子即ち Tau や GSK-3 $\beta$  について検討したが、PS1 遺伝子型による差異は認められなかった。従って変異型 PS1 は IRE1 のリン酸化を選択的に抑制し、UPR を抑制することが示唆された。

## D. 考察

これまでの報告で、変異型 PS1 は、血清・栄

養因子除去、カルシウム負荷や A $\beta$  の添加による刺激に対し細胞の脆弱性を増すことが示されている。正常細胞では、このような状況下で、GRP78、GRP94 などの分子シャペロンが UPR の結果として発現誘導され、正常な蛋白の折り畳みを促し、正常化すると考えられている。我々の結果は、変異型 PS1 が UPR の1つである GRP78 の発現誘導を抑制し、それが細胞の脆弱性をもたらすことを示唆している。

UPR は ER 膜上にある IRE1 によって unfolded protein が ER 内に蓄積していることを感知することから始まる。IRE1 は自己リン酸化を受け、ダイマーを形成し、シグナルを下流に伝達する。今回我々の結果は、変異型 PS1 がこの IRE1 のリン酸化を抑制して、UPR をダウンレギュレーションし、それが細胞の脆弱性をもたらすことを示唆している。酵母では IRE1 のリン酸化の制御は serine/threonine phosphatase Ptc2 によるとされている。従って、変異型 PS1 は IRE1 と Ptc2 の関連に関与することで、IRE1 のリン酸化に影響をあたえるものと理解される。今回の結果では、PS1 が IRE1 に結合することが示され、この結合の度合いは野生型と変異型間で差がなかった。野生型 PS1 の UPR に対する影響については PS1 のノックアウト細胞を用いての検討を待たねばならないが、今回の結果は、変異型 PS1 が gain of function 的に IRE1 のリン酸化を抑制することが示唆される。

変異型 PS1 は APP の代謝に影響を与え、A $\beta$ 1-42 上昇をもたらすとされている。ER と ER-Golgi intermediate compartment が A $\beta$ 1-42 産生には重要な場とされている。unfolded protein は細胞表面に到達するのを防ぐため、逆行性輸送により、ER に戻されるという機構が存在するとの報告がある。変異型 PS1 が発現する細胞に認められる UPR の異常は、unfolded

APP が大量に ER に引き戻され、その結果 A $\beta$ 1-42 が大量に産生されると考えられる。GRP78 を遺伝し導入することにより、A $\beta$  産生を減少させるとの報告がある。

## E. 結論

変異型の PS1 は、ER stress センサー分子である IRE1 の自己リン酸化を抑制し、ER stress 下での GRP78 発現を低下させ、神経細胞の脆弱性を上昇させることが示唆された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表:

- ① Katayama T, Imaizumi K, Sato N, Miyoshi K, Kudo T, Hitomi J, Morihara T, Yoneda T, Gomi F, Mori Y, Nakano Y, Takeda J, Tsuda T, Itoyama Y, Murayama O, Takashima A, St George-Hyslop P, Takeda M, Tohyama M. Presenilin-1 mutations downregulate the signalling pathway of the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol.* 1999 Dec;1(8):479-485.
- ② Tanimukai H, Tsujio I, Hashimoto R, Kudo T, Kamino K, Shinozaki K, Takeda M. Presenilin-2 mutation and polymorphism in Japanese Alzheimer disease patients. *Clin Chim Acta.* 1999 May;283(1-2):57-61.
- ③ Nakano Y, Kondoh G, Kudo T, Imaizumi K, Kato M, Miyazaki JI, Tohyama M, Takeda J, Takeda M. Accumulation of murine amyloidbeta42 in a gene-dosage-dependent manner in PS1 'knock-in' mice. *Eur J Neurosci.* 1999 Jul;11(7):2577-81.
- ④ Tanimukai H, Sato K, Kudo T, Kashiwagi Y, Tohyama M, Takeda M. Regional distribution of presenilin-1 messenger RNA in the embryonic rat brain: comparison with beta-amyloid precursor protein messenger RNA localization.

Neuroscience. 1999 Apr;90(1):27-39.

2. 学会発表

① T.Kudo, K.Imaizumi, Y.Nakano, H.Tanimukai, T.Katayama, N.Sato, T.Morihara, M.Tohyama, J.Takeda, M.Takeda. Impairment of Response to ER Stress in Presenilin Mutant. International Symposium on Dementia, Kobe Int'l Conference Center, 9/11/99.

② T.Kudo, K.Imaizumi, Y.Nakano, H.Tanimukai, T.Katayama, N.Sato, T.Morihara, M.Tohyama, J.Takeda, M.Takeda. Impairment of response to ER stress in presenilin 1 knock-in mice. Annual Meeting, Society for Neuroscience, Miami, 10/26/99.

# 老化および精神機能と免疫能の相関

新井平伊

(順天堂大学医学部精神医学教室教授)

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、リンパ球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、年齢との相関性を調べた。また、別の健常者50名を対象にNK細胞活性、リンパ球サブセット、サイトカイン産生能を測定し同時に心理検査を施行し、その相関性について検討した。その結果、NK細胞活性は年齢との相関性は無かったが、NK細胞数は活性の高いサブセットを中心に年齢と正の相関性が見られた。またNK細胞活性は精神状態に影響を受ける可能性が示唆された。今後はこれら各種サイトカイン産生能に影響を及ぼす加齢変化および精神状態、内分泌系の変化を含めて相互にどう作用しあうのかを明らかにする必要があるものと思われた。

キーワード：ナチュラルキラー、NK、老化、加齢、サイトカイン、精神機能

## 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

うつとの相関性および加齢変化についていくつかの報告がなされているが、統一した見解は未だ得られていない。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活性の精神状態との相関性や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。

## B. 研究方式

### (加齢による免疫機能の変化)

#### 1. 対象

本研究の目的および意義について説明し、文書により同意を得られた21歳から76歳の91名（男性56名、女性35名）の健常者を対象とした。その平均年齢は $43.03 \pm 17.83$ 歳（mean  $\pm$  SD）で、男性の平均年齢は $44.77 \pm 2.31$ 歳、女性は $40.26 \pm 18.63$ 歳であった。t検定で男女間に有意な年齢差はなくF検定にて男女間での年齢の分散は等しかった。

#### 2. 方法

##### (NK細胞活性の測定)

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  $1 \times 10^6$ /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  $\mu$  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  $1 \times 10^6$  / 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%CO<sub>2</sub> 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  $\gamma$ -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。

##### (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。

#### (サイトカイン産生能の測定)

細胞濃度を $1 \times 10^6$  /mlに調整したリンパ球にPMAおよびionomycinを添加して5%CO<sub>2</sub>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 $\beta$ 、4、インターフェロン (IFN) - $\gamma$ 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。

#### (精神機能と免疫機能の相関性)

##### 対象および方法

本研究の目的および意義について説明し、文書により同意を得られた男女各25名の計50名の健常者を対象とし、その年齢は20歳から44歳までで、平均 $28.42 \pm 6.67$ 歳(男性平均31.80歳、女性平均25.04歳)である。いずれも身体的な基礎疾患や精神疾患は無く、日常規則正しい生活を送っている。t検定およびF検定では男女間に有意差は認められず、年齢の分散も等しかった。NK細胞活性サブセットおよびサイトカイン産生能の測定等は上記と同様の手順で行い精神状態の評価のために採血と同日にSDS, CMIを施行した。またNK細胞活性に従い、その平均値 $\pm$ SDで高値群、中間群、低値群の3群に分類した。

## C. 研究結果

### (加齢による免疫機能の変化)

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高いサブセット(CD16<sup>+</sup>56<sup>+</sup>3<sup>-</sup>)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<sup>+</sup>56<sup>-</sup>3<sup>-</sup>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<sup>-</sup>56<sup>+</sup>3<sup>-</sup>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- $\gamma$ 産生能は平均値 $640.20 \pm 314.02$ 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 $\beta$ は平均値 $133.89 \pm 70.63$ 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 $9.30 \pm 15.84$ 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( $p < 0.05$ )。

### (精神機能と免疫機能の相関性)

NK細胞活性の平均値は $46.78 \pm 11.22\%$ で、男性が $50.28 \pm 10.08\%$ 、女性が $43.48 \pm 11.24\%$ で女性に比して男性の

方が高値を示し、統計学的（二標本 t 検定）に有意差が認められた。リンパ球サブセットでは、[CD3-, CD16-, CD56+] 細胞において男性が女性よりも有意な高値を示したが、その他の細胞については有意差がなく、NK 細胞数にも有意差は認められなかった。NK 細胞活性を高値群 (mean±SD: 59.13±3.91%)、中間群 (mean±SD: 44.64±6.70%)、低値群 (mean-SD: 28.86±3.63%) の 3 群に分類し、この 3 群とリンパ球サブセットの比率を比較したところ、NK 細胞数は NK 細胞活性高値群が 15.68±4.57% で低値群が 11.07±6.77% で統計学的有意差が認められた (p<0.01)。NK 細胞活性値の高値群、中間群、低値群の 3 群において、SDS、CMI との関連性を検討した。高値群の SDS の値は 35.87±4.36、低値群は 43.43±11.96 で統計学的有意差が認められた (p<0.05)。また CMI の physical complaints については 3 群間に有意差はなかったが、mental complaints は高値群に比べ、低値群が高値を示し、統計学的有意差が認められた (p<0.05)。サイトカイン産生能については INF- $\gamma$  は高値群が 416.85pg/ml、中間群が 439.82pg/ml、低値群が 459.04 pg/ml で IL-2 は高値群が 1119.61pg/ml、中間群が 1346.32pg/ml、低値群が 1430.70pg/ml でいずれも心理検査および NK 細胞活性との有意な相関性は認められなかったが、NK 細胞活性が低下するに従って高濃度になる傾向が伺われた。

#### D. 考察

近年、免疫学と神経生物学の進歩につれて免疫系と中枢神経系との関連が注目されるようになった。脳と免疫はその動作様式を考えると、かなり類似している部分がある。いずれも生体内外の環境因子を認識し、それに応じて生体反応を起こす刺激-反応系であり、前者はノルアドレナリン、セロトニンなどの伝達物質を、後者は免疫グロブリン、インターロイキンなどを細胞間の情報伝達因子に用いる。さらに両者は一度受けた刺激の記憶を形成し、環境因子の変動の検知などの共通のメカニズムを持っている。元来、免疫系はそれ自体が閉じた系として考えられてきたが、近年の研究では脳から免疫系にシグナルが送られるという相互間の「対話」があり、両者は緊密な連携をもったシステムと考えられるようになった。このような脳-免疫連関から、精神科領域では精神活動と免疫機能あるいは免疫反応との関連性が注目されてきており、免疫機能を評価する指標として Natural Killer(NK)細胞活性を用いた精神免疫学的研究がすすめられている。NK 細胞は T 細胞や B 細胞のように抗原の提示があって免疫が獲得されるのではなく、明らかな抗原による感作なしに標的細胞を自然に殺すことができる MHC (主要組織適合遺伝子複合体) 非拘束性キラー活性をもつリンパ球である。形態学的には LGL (large granular

lymphocyte)で、表面マーカーからは免疫グロブリンの Fc 部分に対するレセプター (Fc $\gamma$ レセプター) の一種 (Fc $\gamma$  II R, CD 番号では CD16) を有し、かつ CD56 (Leu19/NKH-1)を有する、non-T, non-B のリンパ球である。またインターロイキン (IL)やインターフェロン (IFN)などのサイトカインを産生し、腫瘍細胞やウイルス感染の際の生体防御反応の調節や恒常性の維持を行なうとともに、NK 細胞自体もサイトカインにより活性や産生の調節を受けている。NK 細胞は自然免疫で中心的役割を演じ、その活性は免疫機能を示す指標の一つになりうると思われている。この NK 細胞数や活性は運動や喫煙習慣、薬剤等でも変化し、年齢でも差が認められる。

加齢による NK 細胞の変化については 1980 年頃より様々な研究がなされている。加齢により NK 細胞活性が上昇すると Batory ら, Krishnaraj ら, Harada らは報告しているが、反対に Marinira らや Mysliwska らは活性は低下すると報告しており統一した見解は得られていない。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- $\gamma$ であるが、今回の結果では IFN- $\gamma$ 産生能の増加がみられた。しかし IFN- $\gamma$ 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。

一方、ストレスによる NK 細胞活性の変化については比較的新しい見解であり、これについても様々な研究報告がなされている。慢性疲労症候群(CFS)の患者では NK 細胞活性が著しく低下しているといわれ、うつ病の患者にも同様に NK 細胞数および活性の低下が認められたとの報告がある。健常人でも伴侶との死別、離婚などの生活上の出来事を体験した女性ではリンパ球幼若化反応が正常人よりも低下しているという報告がなされている。

今回我々は NK 細胞活性の強度とリンパ球数の相関性、また心理検査との関連性を検討するために、NK 細胞活性を 3 群に分けたところ、NK 細胞数は高値群の方が多く、低値群は高値群に比べ、SDS が高かった。CMI では physical complaints には有意差はなく、mental complaints が高かった。上記の結果より、NK 細胞活性は情動変化がその低下に関与している可能性が示唆された。また NK 細胞数も NK 細胞活性と相関していることから、情動変化は活性のみならず細胞数にも影響を与えている可能性が推測された。増田らは健常成人男性の NK 細胞活性と心理行動特性について、NK 細胞活性が低値のものは消極的で内向的な心理行動特性を持ち、多くのライフイベントストレスを抱え、抑うつ的になりやすく、高値のものは積極的、外向的で神経症性が低いと報告している。

また Lee らは神経症患者の NK 細胞活性の低下には抑うつ感情とストレスに対する不適応行動が関係していると報告しており、我々の結果もこれらに準ずるものとなった。情動変化と NK 細胞活性の低下についてはいくつかの報告がなされており、そのメカニズムについても諸説あるが、抑うつ感情と伴うストレスが内分泌異常を誘発するという説がある。これはうつ病の患者では、視床下部—下垂体—副腎系(HPA)の異常を伴うことがあり、特に重症うつ病では、Free Cortizol 値の上昇と Dexamethazone 抑制試験の非抑制がみられる。一方、副腎皮質ステロイドはリンパ球増殖の抑制と、ヘルパー T 細胞の機能の抑制を起こすと言われている。したがって、うつ病の患者で報告されているリンパ球機能の低下は、HPA 系以外にも、視床下部—下垂体—甲状腺、成長ホルモンあるいは性ホルモンなどの内分泌学的異常があることは指摘されているため、これらの関与も否定できない。サイトカイン産生能についての結果では NK 細胞活性が低下するに従い、IFN- $\gamma$ および IL-2 の産生能は上昇する傾向が見られた。前述の通り、IFN- $\gamma$ や IL-2 は NK 細胞活性に促進的に働くためこの結果は矛盾がないものと思われる。また末梢血中のサイトカインは神経のアストロサイトや血管内皮細胞等から産生されるが、一部 NK 細胞からも産生されている。NK 細胞自身もその表面に存在するレセ

プターに IFN などのサイトカインが結合することによりキラー活性を調節されている。つまり、うつ病の患者ではサイトカインの産生能の低下、またはリンパ球表面のサイトカインレセプターの感受性もしくは構造に変化をきたしている可能性も考えられる。

## E. 結論

健常成人における免疫機能の加齢および精神状態による変化について検討した。加齢による NK 細胞活性は変化が見られないものの、NK 細胞数の加齢による増加が認められた。これは、個々の NK 細胞活性の低下を NK 細胞数の増加により補っている可能性が考えられた。関連するサイトカイン産生能については加齢により上昇する傾向が伺われたが、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。

また情動変化が免疫機能に影響を与えることが示唆された。情動変化は NK 細胞活性には影響を与えることが認められたが、NK 細胞数には影響が見られなかった。この点では加齢とは違うメカニズムで免疫機能に影響を与えていることが示唆された。しかし、そこには実に様々な調節因子が存在し、一元論的には説明が困難である。

動物実験ではストレスを加えたり、うつ病のモデルを作ることで免疫機能の抑制が示されているが、ストレスの種類によっては逆に免疫系の活性を賦活する場合もある。また内分泌系も免疫系に影響を与えることが予測され、今後は加齢、情動変化および内分泌系の変化が免疫機能に与える相互の関連性を検討する必要性があるものと思われる。

## F. 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 N. Shibata, T. Ohnuma, H. Arai et al: Genetic association between alpha-2 macroglobulin and Japanese sporadic Alzheimer's disease. Neuroscience Letters 271 (1999) 132-134
- ③ M. Kimura, T. Asada, H. Arai et al.: Assessment of cerebrospinal fluid levels of serum amyloid P component in patients with Alzheimer's disease. Neuroscience Letters 273 (1999) 137-139

### 2. 学会発表

- ① 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.

② T. Ishizuka, H. Baba, Y. Nozaki, I. Takagi, M. Tsuji, K. Eto,  
Y. Ichimiya, H. Arai; Natural Killer Cell Activity in Relation to  
Mental Condition in Healthy Adults, The 9<sup>th</sup> Scientific Meeting  
of the Pacific Rim of The Psychiatrists, 1999.

## 老化におけるラット海馬の活性型プロテインキナーゼ B/Akt 発現の変化に関する研究

分担研究者 神庭重信 山梨医科大学精神神経医学講座 教授

研究協力者 久保田正春、丹羽政信、杉山仁視、小林一彦

山梨医科大学精神神経医学講座

プロテインキナーゼ B/Aktの活性型であるリン酸化Akt(pAkt)はアポトーシスの抑制作用を持つことが知られている。我々はpAktの免疫活性をもつAkt陽性細胞がラットのCA1 領域で、対照の若令ラット(8週令)と比較して多いことを明らかにし、このpAkt陽性細胞の増加が、リン酸化の障害というよりむしろAkt発現の差によって生じている可能性を示唆した。また、CA1 領域では、DA 領域で認められる TUNEL 陽性細胞数の変化が認められないことから、CA1領域のpAktが、同領域のアポトーシスの廊下による増加の抑制を行っている可能性を示唆した。

キーワード: 老化、プロテインキナーゼ B/Akt、TUNEL 法、海馬

### A. 研究目的

老化、アルツハイマー型痴呆、PTSD、反復性うつ病などで海馬の萎縮が報告されている。この海馬の萎縮にはアポトーシスが関与しているといわれている。アポトーシス制御にはさまざまな因子が知られ(Adamson,1998)、カイン酸(Pollard,1994)、酸化ストレス(Adams,1996)、副腎摘除(Cameron,1996)などがアポトーシスを誘発し、Bcl-2 や Bax(Kroemer,1997)、プロテインキナーゼ B/Akt (Akt)(Coffer,1998)、がこれを抑制することが報告されている。

老化においては、視床下部—下垂体—副腎皮質系の異常も報告されていることから、これらの萎縮はこれまでグルココルチコイドの過剰分泌との関係で論じられることが多かった。Hassan(1996、1997)らは彼らの論文の中で、老令ラットの海馬でのグルココルチコイド受容体の減少を報告している。グルココルチコイドは細胞の生存と

死を制御していることが多くの *in vitro* の検討で示されていることから老化における海馬の脆弱性にはやはりグルココルチコイドが関与していることが推測される(Hassan,1996; Gould,1996; Almeida,1997)。

一方、Akt はこれまでの *in vitro* での検討から、様々な神経成長因子が細胞の生存を助ける際に必要とされることがまず明らかとなった(Kulik,1997; Crowder,1998; Downward,1998; Coffer,1998)。その後の検討でAktは神経成長因子により活性化されたPI3キナーゼにより活性化され、活性型Aktは作用する時に Bcl-2 を介して、細胞死(アポトーシス)と関係することが報告されている(Datta,1997)。また、このキナーゼはその他にグルコース代謝や蛋白合成など様々な作用を示すことが明らかとなっている。*in vitro* ではこのように作用が明らかとなってきている Akt である(Kennedy,1997; Yao,1995; bellacosa,1998;