

199900390A-B

平成 9-11 年度厚生科学研究費補助金
(脳科学研究事業)

研究報告書

(総括研究報告書、分担研究報告書、総合研究報告書)

課題名：うつ病の発症機序と治癒機転の分子生物学的研究
(H10 - 脳 - 017)

主任研究者

国立精神・神経センター国府台病院

樋口 輝彦

厚生大臣 丹羽 雄哉 殿

住 所 〒

フリガナ ヒグチ テルヒコ

研究者 氏 名 樋口 輝彦

(所属施設 国立精神・神経センター 国府台病院)

平成11年度厚生科学研究費補助金(脳科学研究事業)に係る研究事業を完了したので、次のとおり報告する。

研究課題名(課題番号) : うつ病の発症機序と治癒機転の分子生物学的研究(H10-脳-017)

国庫補助金精算所要額: 金 23,000,000 円也

1. 厚生科学研究費補助金総括研究報告書概要版及びこれを入力したフロッピーディスク(別添1のとおり)
2. 厚生科学研究費補助金総括研究報告書(別添2のとおり)
3. 厚生科学研究費補助金分担研究報告書(別添3のとおり)
4. 研究成果の刊行に関する一覧表

刊行書籍又は雑誌名	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名
Biochem. Biophys. Res. Commun. 261: 541-545. Identification of a novel splice variant of heat shock cognate protein 70 after chronic antidepressant treatment in rat frontal cortex.	1999	Academic Press	Yamada, M., Yamada, M., Kiuchi, Y., Nara, K., Kanda, Y., Morinobu, S., Momose, K., Oguchi, K., Kamijima, K. and Higuchi, T.
J. Neurochem. 72: 2198-2205. Stimulation of adenylyl cyclase and induction of BDNF and TrkB mRNA by NKH477, a novel and potent forskolin derivative.	1999	Lippincott Williams & Wilkins	Morinobu, S., Fujimaki, K., Okuyama, N., Takahashi, M. and Duman, R.S.
Synapse 31: 20-28. Neuroleptics with differential affinities at dopamine D2 receptors and sigma receptors affect differentially the N-methyl-D-aspartate-induced increase in intracellular calcium concentration: involvement of protein kinase.	1999	John Wiley and Sons	Hayashi, T., Su, T.-P., Kagaya, A., Nishida, A., Shimizu, M. and Yamawaki, S.
J. Neural Transm. 106: 23-33. Effect of acute and chronic administration of dehydroepiandrosterone on (±)-1-(2,5-dimethoxy-4-iodophenyl)-2-aminopropane-induced wet dog shaking behavior in rats.	1999	Springer Verlag	nagaki, M., Kagaya, A., Takebayashi, M., Horiguchi, J. and Yamawaki
Psychopharmacology 142: 289-294. The relationship of the platelet 5-HT-induced calcium response to clinical symptoms in eating disorders.	1999	Springer Verlag	Okamoto, Yu., Okamoto, Y., Kagaya, A., Horiguchi, J. and Yamawaki, S.

刊行書籍又は雑誌名	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名
Mol. Neurobiol. 19: 109-117. Alteration of tubulin function caused by chronic antidepressant treatment in rat brain.	1999	Human Press	Kamada, H., Saito, T., Hatta, S., Toki, S., Ozawa, H., Watanabe, M., and Takahata N.
脳の科学 21: 297-301. 脳機能改善薬アニラセタム慢性投与後の線条体cAMP産生能とアデニル酸シクラーゼ発現変化.	1999	星和書店	鶴飼 涉, 小澤寛樹, 山口高史, 池田官司, 橋本恵理, 七戸 真, 石川博基, 齋藤利和
Brain Res. 824: 300-303. Impaired phosphorylation of cyclic AMP response element binding protein in the hippocampus of the Alzheimer type.	1999	Elsevier	Yamamoto-Sasaki, M., Ozawa, H., Saito, T., Rosler, M. and Riederer P.
精神薬療基金研究年報 31: 179-185. セカンドメッセンジャー不均衡仮説に基づく気分障害患者死後脳及び末梢マーカーに関する研究.	1999	精神神経系薬物治療研究基金	山口高史, 小澤寛樹, 鶴飼 涉, 常松理枝子, 橋本恵理, 石川博基, 七戸真, 齋藤利和, 高畑直彦
Biochim. Biophys. Acta 1454: 11-18. Quantitative reduction of type I adenylyl cyclase in human alcoholics.	1999	Elsevier	Sohma, H., Hashimoto, E., Shirasaka, T., Tsunematsu, R., Ozawa H., Boissl, K.W., Boening, J., Riederer, P. and Saito, T.
脳の科学 21: 359-367. 感情障害とセカンドメッセンジャー-アデニル酸シクラーゼ (AC) 系とホスホリパーゼC(PLC)系の不均衡仮説一.	1999	星和書店	小澤寛樹, 山口高史, 鶴飼 涉, 常松理枝子, 齋藤利和
臨床と研究 76: 285-289. うつ状態.	1999	大道学館出版部	白山 幸彦、樋口 輝彦
臨床医学講座第21巻「脳と行動」pp235-253. 神経伝達物質と精神活動.	1999	中山書店	樋口 輝彦
脳21. 3: 63-70. 新しい抗うつ薬の基礎と臨床—うつ病とセロトニン—.	2000	金芳堂	樋口 輝彦
Neuropsychopharmacology 22: 42-51. Administration of a cAMP Phosphodiesterase 4 inhibitor Enhances Antidepressant-induction of BDNF mRNA in rat hippocampus.	2000	Elsevier	Fujimaki, K., Morinobu, S. and Duman, R.S.
Neuropsychobiology 41: 55-61. The effect of lithium carbonate on the enhancement of serotonin-2A receptor elicited by dexamethasone.	2000	S. Karger AG	Jitsuiki, H., Kagaya, A., Goto, S., Horiguchi, J. and Yamawaki, S.
Prog. Neuro-Psychopharmacol. & Biol. Psychiat. 24: 85-95. Lithium chloride inhibits thrombin-induced intracellular calcium mobilization in C6 glioma cells.	2000	S. Karger AG	Kagaya, A., Okada, A., Tawara, Y., Inagaki, M., Jitsuiki, H., Kozuru, T., Miyoshi, I., Katagiri, H., Uchitomi, Y., Horiguchi, J., Nakata, Y. and Yamawaki, S.

刊行書籍又は雑誌名	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名
Life Sci. Chronic electroconvulsive shock decreases (\pm)1-(4-iodo-2,5-dimethoxyphenyl)-2-aminopropane hydrochloride (DOI)-induced wet-dog shake behaviors of dexamethasone-treated rats.	in press	Pergamon Press	Kozuru, T., Kagaya, A., Takebayashi, M., Horiguchi, J. and Yamawaki, S.
Neuropsychobiology Effects of antidepressants on γ -aminobutyric acid- and N-methyl-D-aspartate-induced intracellular Ca^{2+} concentration increases in primary cultured rat cortical neurons.	in press	S. Karger AG	Takebayashi, M., Kagaya, A., Inagaki, M., Kozuru, T., Jitsuiki, H., Kurata, K., Okamoto, Y. and Yamawaki, S.
J. Neural Transm. Effect of heat stress on serotonin-2A receptor-mediated intracellular calcium mobilization in rat C6 glioma cells.	in press	Springer Verlag	Kagaya, A., Okada, A., Jitsuiki, H., Tawara, Y., Inagaki, M., Takebayashi, M., Saeki, T., Nishida, A., Nakata, Y. and Yamawaki, S.
Clin. Neuropharmacol. Regulation of phosphorylation of cyclic AMP response element binding protein by paroxetine treatments.	in press	Lippincott Williams & Wilkins	Morinobu, S., Russel, D.S., Sugawara, S., Takahashi, M., and Fujimaki, K.
Neuropsychobiology Plasma concentrations of interleukin- β , interleukin-6, soluble interleukin-2 receptor and tumor necrosis factor α of depressed patients in Japan.	in press	S. Karger AG	Kagaya, A., Kugaya, A., Takebayashi, M., Fukue-Saeki, M., Saeki, T., Yamawaki, S. and Uchitomi, Y.

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 国立精神・神経センター 国府台病院副院長

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与する脳内分子を初年度、2年度に引き続き検討し、以下の所見を得た。(1) RNA-fingerprinting法及びcDNA microarrayにより、抗うつ薬の連続投与後にラット前頭葉皮質、視床下部で発現が増加する多種の遺伝子 (cysteine string protein、kf-1など) を見出した。(2) ラット大脳皮質前頭部・海馬内のリン酸化CREB発現およびカルシニューリン活性は急性拘束ストレス負荷後とparoxetine急性投与後に増加したが、14日間連続投与後は変動はみられなかった。(3) 培養グリア細胞の5-HTT 発現量はbFGF添加で増加した。ラット脳虚血周辺部でbFGFと5-HTT発現が増加し、SSRIのsertraline前処理時には脳梗塞巣が増大した。(4) dexamethasone反復処置ラットでDOI誘発性wet dog shake、5-HT-2A受容体数およびKCl刺激性 $[Ca^{2+}]_i$ 変化が有意に亢進し、電撃、nimodipine・リチウム慢性処置で一部改善した。(5) アルツハイマー病死後脳では Ca^{2+} 刺激性AC活性とp-CREBの低下が、精神分裂病では Ca^{2+} 刺激性ACの亢進が認められた。単極性うつ病と精神分裂病に共通して5HTに関連したIPsシグナルカスケードの亢進が生じていた。以上より、うつ病の発症機序と抗うつ薬の奏効機転にはCREBなどの転写因子のリン酸化も含む細胞内情報伝達系の変動と未知遺伝子産物も含む多種の機能性蛋白の発現変化が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 広島大学医学部神経精神医学助教授
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

うつ病は有病率が4%にもものぼるといわれ、そ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。従来よりうつ病態と抗うつ作用の解明は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いて行われてきたが、現在でもその神経化学的基盤は明らかでなく、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变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細胞内情報伝達系や細胞内 Ca^{2+} 動態に作用する可能性も指摘され、その作用機序解明には情報伝達系に関与する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。

本研究の2年度までに以下の研究成果が得られた。

(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 HSC49のほかfrizzled-3-protein, rin, thioredoxinなど) を見出した。(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 (PKA) 活性が亢進した。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たが、脱リン酸化酵素カルシニューリン mRNA発現は変化しなかった。(3) PC12細胞のノルアドレナリントランスポーター機能とその発現量は、 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促進され、抗うつ薬の長期添加により抑制された。(4) 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+} 動員系がプロテアーゼ依存性に抑制され、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cAMP産生系とIPs産生系のいずれもが有意に変動し、また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5-HT刺激性Ca²⁺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、ストレス負荷または抗うつ薬投与時には神経細胞内で、CREBのリン酸化能やCa²⁺動員などの細胞内情報伝達系の活性変化とともに、転写調節因子も含む複数の未知遺伝子産物の発現変化が生じている可能性が示された。そこで3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imipramineあるいはsertraline 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を任意の配列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産物のバンドの塩基配列を決定し、既知の遺伝子の塩基配列との相同性検索を行った。さらに、これらのcDNA 200種を用いて独自のcDNA microarrayを開発し、改めてコントロール及び薬物投与群のラット脳のcDNAとハイブリダイズし発現の増減を確認した。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。未知遺伝子の場合はRACE法で全塩基配列を決定した。

(2) SSRIであるparoxetine (7.5 mg/kg)の急性または14日間連続投与後、あるいは急性拘束ストレス後のラット大脳皮質前頭部・海馬内のCREBとリン酸化CREB (p-CREB)発現の変動をimmunoblot法を用いて検討した。また、抗うつ薬あるいは急性拘束ストレス(45分間)負荷のカルシニューリン (CaN) 活性とCaN mRNA発現 (in situ hybridization法)に及ぼす効果も合わせて検討した。

(3) 培養ヒトグリア細胞を用いモノアミントランスポーターmRNAの発現の検出 (RT-PCR法)と塩基配列解析を行った。また、培養グリア細胞にEGF, bFGFを添加後、³Hセロトニン取り込み能とトランスポーター遺伝子発現量の変化を検討した。さらにラット脳虚血モデル (中大脳動脈閉塞)を用い梗塞周辺部 (大脳皮質、線条体)のモノアミントランスポーター及びbFGFのmRNA発現の経時変化と抗うつ薬前処理の脳梗塞領域に及ぼす影響を検討した。

(4) ラットにDexamethasone (Dex, 1mg/kg, s.c.)

を14日間処置後、5-HT_{2A}受容体作動薬DOI (1 mg/kg, s.c.)誘発性のwet dog shake (WDS)を観察した。約24時間後に大脳皮質の粗膜画分の5-HT_{2A}受容体結合能 (³Hケタンセリン結合)およびホスホリパーゼC(PLC)、Gq蛋白、IP₃受容体の発現量 (特異抗体を用いたWestern blotting)を測定した。また、海馬領域を含む冠状断スライスにfura-2/AMを負荷し、KCl刺激性 (50 mM, 2 min)の[Ca²⁺]_i変化を観察した。また、上記に対する電撃、リチウムおよびニモジピンの影響も観察した。

(5) 昨年までに報告したうつ病患者死後脳の生化学的变化と他の精神疾患における変化を比較するためにアルツハイマー病および精神分裂病死後脳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PLC活性、I型AC、PLCβ、総CREB、p-CREB蛋白量 (Immunoblotting法)を検討した。

C. 研究結果

(1) これまでRNA-fingerprinting法により2種の抗うつ薬の連投後に共通して特異的に増減しているバンドを合計200確認し (Antidepressant related gene: ADRG 1 - 200)、塩基配列の決定と既知の遺伝子との相同性検索を行った。また、開発したcDNA microarrayを用い、改めて抗うつ薬連投ラットの前頭皮質、視床下部で多岐にわたる遺伝子群の発現変化が生じていることを確認した。それらを機能別には1) 受容体及び細胞内情報伝達系 2) タンパク質折り畳みと輸送 3) 細胞障害・酸化還元系クローン 4) 神経特異的に発現するクローン 5) その他、に分類された。そのうち特に発現が増加したADRG-30は神経終末のカルシウムチャネルの抑制に不可欠なcysteine string protein mRNAと96.4%の、ADRG-34はマウスkf-1と95.7%のホモロジーを示した。さらに作成した抗体で蛋白レベルの検討とうつ病患者死後脳における発現を検討中である。

(2) ラット大脳皮質前頭部・海馬内のp-CREB発現量はPRX急性投与30分後に発現亢進をみたが、14日間連続投与後は変動はみられなかった。急性拘束ストレス負荷もp-CREB発現を亢進させた。いずれの処置でもCREB発現量は変動しなかった。急性拘束ストレス負荷後、CaN mRNA発現は海馬CA3、歯状回では変化なくCA1錐体細胞層でのみ減少し、CaN活性は大脳皮質前頭部・海馬で有意に亢進した。PRX、imipramineの急性投与1時間後、CaN活性の亢進をみたが、14日間連続投与後、大脳皮質前頭部では変動はみられなかった。

(3) 正常ヒトアストロサイト (NHA)及び各種ヒトグ

リオーマ由来培養細胞にはセロトニントランスポーター(5-HTT)が発現しセロトニン取り込みを行っていることが示された。bFGF添加によりNHAの5-HTT発現とセロトニン取り込みが増加した。in vivoではラットの脳虚血周辺部でbFGFと5-HTT発現が増加し、SSRIのsertraline前処理時には虚血後の脳梗塞巣の増大が認められた。

(4) Dex反復処置ラットでDOI誘発性WDS、5-HT-2A受容体数およびKCl刺激性 $[Ca^{2+}]_i$ 変化が有意に亢進していた。一方、PLC、Gq蛋白、 IP_3 受容体の発現量はDexにより変化しなかった。電撃あるいはnimodipine慢性処置によりDexによるWDS亢進は改善したが、その他は無影響だった。一方、リチウム慢性処置では、WDSおよび $[Ca^{2+}]_i$ 変化が改善した。

(5) アルツハイマー病死後脳ではI型AC量低下に伴う Ca^{2+} 刺激性ACの減弱とp-CREBの低下が認められた。精神分裂病ではACの基礎活性、マンガン刺激活性は不変であったが、I型AC量増加に伴う Ca^{2+} 刺激性ACの亢進が認められた。一方、慢性精神分裂病ではcAMP産生機能の増強が認められた。さらに単極性うつ病と精神分裂病群双方に共通してセロトニンに関連した IP_3 シグナルカスケードの亢進が生じていた。

D. 考察

Differential Display法(RNA-fingerprinting法)及びそれに引き続くcDNA microarrayによる検討で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。その結果、抗うつ薬連続投後にラット前頭皮質及び視床下部で多岐にわたる遺伝子(HSC70のsplice variant HSC49のほかfrizzled-3-protein, rin, thioredoxin, cysteine string protein, kf-1など)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は神経機能やストレスとの関連が推測される蛋白などいくつかの機能別に分類される。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、cDNA microarrayを活用し、抗うつ薬、他のうつ病治療法、種々のモデル動物での大量の遺伝子発現をスクリーニングしさらに候補遺伝子を絞り込む予定である。

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、前年までの結果と合わせて総括するとストレス(あるいはDex)負荷、抗うつ薬投与のいずれの場合でもPKAなどのタンパクリン酸化酵素活性やリン

酸化CREBの増加や細胞内 Ca^{2+} 動態の変化が生じる可能性が示唆された。

対照的に、うつ病患者の死後脳ではcAMP産生系、 IP_3 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。これらの変化は、アルツハイマー病や精神分裂病と一部は共通しているが明らかにうつ病に特徴的であった。

これらの結果を総合的に解釈すると、うつ病の発症機序と抗うつ薬の作用機序に関して以下のような仮説が考えられる。強いストレスは通常、視床下部・辺縁系・前頭葉皮質などの情動調節系でモノアミン神経系を刺激し、AC活性、PKA活性の促進などによりCREBをはじめとする転写促進因子のリン酸化を増加させる。その結果、ストレス応答性の何らかの機能性蛋白の発現が徐々に増加し、ストレスに対しての馴化、適応を獲得し、ストレスが繰り返されても初期の反応が抑制される。しかし、うつ病患者ではcAMP産生系と IP_3 産生系の不均衡が生じ、リン酸化CREBが低下しているなどから、上記のような生化学的な適応現象が破綻しており、結果としてストレスへの馴化が得られない。抗うつ薬はPKA活性化やCREBなどの転写因子のリン酸化の促進によりこの過程を促進して機能性蛋白の発現を増加させる。

今後はRNA-fingerprinting法で解析された候補遺伝子群を絞り込み、上述の仮説で示した機能性蛋白を明らかにするとともに、細胞内情報伝達系の変化についても多くのモデルに共通した変化を見いだす必要があると思われる。このような仮説により、観察されたすべての現象を矛盾なく説明するのは困難であるが、うつ病患者の血小板 Ca^{2+} 動員の変化や抗うつ薬によるモノアミントランスポーターの機能変化なども含めた、より包括的な仮説の構築とその検証を行いたい。

E. 結論

(1) RNA-fingerprinting法及びcDNA microarrayにより、抗うつ薬の連続投与後にラット前頭葉皮質、視床下部で発現が増加する多種の遺伝子(cysteine string protein、kf-1など)を見出した。(2) ラット大脳皮質前頭部・海馬内のp-CREB発現およびCaN活性は急性拘束ストレス負荷後とPRX急性投与後には増加、14日間連続投与後は変動はみられなかった。

(3) 培養グリア細胞の5-HTT発現量と機能はbFGF添加で増加した。ラット脳虚血周辺部でbFGFと5-HTT発現が増加し、SSRIのsertraline前処理時には脳梗塞巣が増大した。(4) Dex反復処置ラットでDOI誘発性WDS、5-HT-2A受容体数およびKCl刺激

性[Ca²⁺]_i変化が有意に亢進し、電撃、nimodipine・リチウム慢性処置では一部が改善した。(5)アルツハイマー病死後脳ではCa²⁺刺激性AC活性とp-CREBの低下が、精神分裂病ではCa²⁺刺激性ACの亢進が認められた。単極性うつ病と精神分裂病に共通して5HTに関連したIPsシグナルカスケードの亢進が生じていた。

以上より、うつ病の発症機序と抗うつ薬の奏効機序にはCREBなどの転写因子のリン酸化も含む細胞内情報伝達系の変動と未知遺伝子産物も含む多種の機能性蛋白の発現変化が関与している可能性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Yamada, M., Yamada, M., Kiuchi, Y., Nara, K., Kanda, Y., Morinobu, S., Momose, K., Oguchi, K., Kamijima, K. and Higuchi, T.: Identification of a novel splice variant of heat shock cognate protein 70 after chronic antidepressant treatment in rat frontal cortex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 261: 541-545, 1999.

Morinobu, S., Fujimaki, K., Okuyama, N., Takahashi, M. and Duman, R.S.: Stimulation of adenylyl cyclase and induction of BDNF and TrkB mRNA by NKH477, a novel and potent forskolin derivative. *J Neurochem.* 72: 2198-2205, 1999.

Hayashi, T., Su, T.-P., Kagaya, A., Nishida, A., Shimizu, M. and Yamawaki, S.: Neuroleptics with differential affinities 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* 31: 20-28, 1999.

Inagaki, M., Kagaya, A., Takebayashi, M., Horiguchi, J. and Yamawaki, S.: 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.* 106: 23-33, 1999.

Okamoto, Yu., Okamoto, Y., Kagaya, A., Horiguchi, J. and Yamawaki, S.: The relationship of the platelet 5-HT-induced calcium response to clinical symptoms in eating disorders. *Psychopharmacology* 142: 289-294, 1999.

Kamada, H., Saito, T., Hatta, S., Toki, S., Ozawa, H., Watanabe, M., and Takahata N.: Alteration of tubulin function caused by chronic antidepressant treatment in rat brain. *cell. Mol. Neurobiol.* 19: 109-117, 1999.

鷓飼 渉, 小澤寛樹, 山口高史, 池田官司, 橋本恵理, 七戸 真, 石川博基, 齋藤利和: 脳機能改善薬アニラセタム慢性投与後の線条体cAMP産生能とアデニル酸シクラーゼ発現変化 *脳の科学* 21: 297-301, 1999.

Yamamoto-Sasaki, M., Ozawa, H., Saito, T., Rosler, M. and Riederer P.: Impaired phosphorylation of cyclic AMP response element binding protein in the hippocampus of the Alzheimer type. *Brain Res.* 824: 300-303, 1999.

山口高史, 小澤寛樹, 鷓飼 渉, 常松理枝子, 橋本恵理, 石川博基, 七戸 真, 齋藤利和, 高畑直彦: セカンドメッセンジャー不均衡仮説に基づく気分障害患者死後脳及び末梢マーカーに関する研究. *精神薬療基金研究年報* 31: 179-185, 1999.

Sohma, H., Hashimoto, E., Shirasaka, T., Tsunematsu, R., Ozawa H., Boissl, K.W., Boening, J., Riederer, P. and Saito, T.: Quantitative reduction of type I adenylyl cyclase in human alcoholics. *Biochim. Biophys. Acta* 1454: 11-18, 1999.

小澤寛樹, 山口高史, 鷓飼 渉, 常松理枝子, 齋藤利和: 感情障害とセカンドメッセンジャー-アデニル酸シクラーゼ (AC) 系とホスホリパーゼC(PLC)系の不均衡仮説 - *脳の科学* 21: 359-367, 1999.

白山 幸彦, 樋口 輝彦: うつ状態. *臨床と研究* 76: 285-289, 1999.

樋口 輝彦: 神経伝達物質と精神活動. *臨床医学講座* 第21巻「脳と行動」pp235-253, 中山書店, 1999.

Fujimaki, K., Morinobu, S. and Duman, R.S.: Administration of a cAMP Phosphodiesterase 4 inhibitor Enhances Antidepressant-induction of BDNF mRNA in rat hippocampus. *Neuropsychopharmacology* 22: 42-51, 2000.

Jitsuiki, H., Kagaya, A., Goto, S., Horiguchi, J. and Yamawaki, S.: The effect of lithium carbonate on the enhancement of serotonin-2A receptor elicited by dexamethasone. *Neuropsychobiology* 41: 55-61, 2000.

Kagaya, A., Okada, A., Tawara, Y., Inagaki, M.,

- Jitsuiki, H., Kozuru, T., Miyoshi, I., Katagiri, H., Uchitomi, Y., Horiguchi, J., Nakata, Y. and Yamawaki, S.: Lithium chloride inhibits thrombin-induced intracellular calcium mobilization in C6 glioma cells. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. & Biol. Psychiat.* 24: 85-95, 2000.
- 樋口 輝彦: 新しい抗うつ薬の基礎と臨床—うつ病とセロトニン—. *脳* 21. 3: 63-70, 2000.
- Morinobu, S., Russel, D.S., Sugawara, S., Takahashi, M., and Fujimaki, K. Regulation of phosphorylation of cyclic AMP response element binding protein by paroxetine treatments. *Clinical Neuropharmacology* (in press).
- Kozuru, T., Kagaya, A., Takebayashi, M., Horiguchi, J. and Yamawaki, S.: Chronic electroconvulsive shock decreases (+)1-(4-iodo-2,5-dimethoxyphenyl)-2-aminopropane hydrochloride (DOI)-induced wet-dog shake behaviors of dexamethasone-treated rats. *Life Sci.* (in press)
- Takebayashi, M., Kagaya, A., Inagaki, M., Kozuru, T., Jitsuiki, H., Kurata, K., Okamoto, Y. and Yamawaki, S.: Effects of antidepressants on γ -aminobutyric acid- and N-methyl-D-aspartate-induced intracellular Ca^{2+} concentration increases in primary cultured rat cortical neurons. *Neuropsychobiology* (in press)
- Kagaya, A., Okada, A., Jitsuiki, H., Tawara, Y., Inagaki, M., Takebayashi, M., Saeki, T., Nishida, A., Nakata, Y. and Yamawaki, S.: Effect of heat stress on serotonin-2A receptor-mediated intracellular calcium mobilization in rat C6 glioma cells. *J. Neural Transm.* (in press)
- Kagaya, A., Kugaya, A., Takebayashi, M., Fukue-Saeki, M., Saeki, T., Yamawaki, S. and Uchitomi, Y.: Plasma concentrations of interleukin-1 β , interleukin-6, soluble interleukin-2 receptor and tumor necrosis factor- α of depressed patients in Japan. *Neuropsychobiology* (in press).
2. 学会発表
久保田信雄、木内祐二、小山田英人、根本麻理子、大野稔、小口勝司. ヒトグリア細胞に発現するノモノアミントランスポーターの解析. 第72回日本薬理学会年会、札幌、1999.
- 山田美佐、山田光彦、木内祐二、奈良圭之輔、百瀬和享、小口勝司、上島国利、樋口輝彦: ラット前頭皮質における抗うつ薬関連遺伝子の特異的発現について. 第72回日本薬理学会年会、札幌、1999.
- Yamada, M., Yamada, M., Kiuchi, Y., Nara, K., Momose, K., Oguchi, K., Kamijima, K. and Higuchi, T.: Differential expression of a novel splice variant of heat shock cognate protein 70 after chronic antidepressant treatment in rat frontal cortex. 29th annual meeting of Society for Neuroscience, Miami, 1999.
- Takebayashi, M., Kagaya, A., Inagaki, M., Tawara, Y., Jitsuiki, H., Kozuru, T., Okamoto, Y., Horiguchi, J. and Yamawaki, S.: Effect of dehydroepiandrosterone on cyclic GMP mobilization in rat C6 glioma cells. 29th annual meeting of Society for Neuroscience, Miami, 1999.
- Miyoshi, I., Kagaya, A., Tawara, Y., Inagaki, M., Jitsuiki, H., Kozuru, T., Katagiri, H., Takebayashi, M., Horiguchi, J. and Yamawaki, S.: Agonist and partial agonist regulation of serotonin-2A receptor-stimulated intracellular calcium mobilization in C6BU-1 glioma cells. 29th annual meeting of Society for Neuroscience, Miami, 1999.
- Katagiri, H., Kagaya, A., Kozuru, T., Jitsuiki, H., Nakae, S., Miyoshi, I., Inagaki, M., Nagaoka, I., Horiguchi, J., and Yamawaki, S.: The effect of calcium channel blocker nimodipine on serotonin-2A receptor-mediated behavioral response and receptor binding in rats chronically treated with dexamethasone. 29th annual meeting of Society for Neuroscience, Miami, 1999.
- Tawara, Y., Kagaya, A., Miyoshi, I., Katagiri, H., Takebayashi, M., Goto, S., Horiguchi, J. and Yamawaki, S.: Effects of fluoxetine and lithium on lipopolysaccharide-induced enhancement of cyclic GMP accumulation in rat C6 glioma cells. 3rd International Conference on Bipolar Disorder. Pittsburg, 1999.
- Inagaki, M., Kagaya, A., Takebayashi, M., Nakae, S., Kozuru, T., Jitsuiki, H., Horiguchi, J., and

- Yamawaki, S.: Effect of dehydroepiandrosterone on serotonin-2A receptor-related behavior. 3rd International Conference on Bipolar Disorder. Pittsburg, 1999.
- Okamoto, Y., Kagaya, A., Jitsuiki, H., Zensho, H., Nishida, A., Horiguchi, J. and Yamawaki, S.: Chronic lithium treatment blunts an excessive noradrenergic response in rat hippocampal slices. 3rd International Conference on Bipolar Disorder. Pittsburg, 1999.
- 山田光彦、山田美佐、木内祐二、奈良圭之輔、森信繁、百瀬和享、小口勝司、上島国利、樋口輝彦：抗うつ薬長期投与によるHSC49の発現とその構造。第29回日本神経精神薬理学会、広島、1999。
- 高橋 淳、田中和秀、李 勝天、加藤邦夫、藤巻康一郎、森信 繁：ラット脳内 calcineurin 活性に及ぼすストレス・抗うつ薬の影響。第29回日本神経精神薬理学会、広島、1999。
- 藤巻康一郎、菅沼幸子、森信 繁、山田尚登、加藤進昌：ストレス負荷および抗うつ薬投与のラット脳内CREBリン酸化への影響。第29回日本神経精神薬理学会、広島、1999。
- 片桐秀晃、加賀谷有行、小鶴俊郎、日域広昭、中江左知子、三好出、稲垣正俊、堀口淳、山脇成人：Dexamethasone 慢性処置ラットにおける serotonin 受容体関連行動に対する L型 calcium channel 拮抗薬 nimodipine の影響。第29回日本神経精神薬理学会、広島、1999。
- 日域広昭、加賀谷有行、小鶴俊郎、中江左知子、片桐秀晃、三好出、岡本泰昌、竹林実、堀口淳、山脇成人：Lithium carbonate と imipramine の併用慢性投与が serotonin-2A 受容体に及ぼす影響。第29回日本神経精神薬理学会、広島、1999。
- 加賀谷有行、山脇成人：感情障害の病因と病態に関する生物学的検討。第29回日本神経精神薬理学会、広島、1999。
- 山田光彦、山田美佐、木内祐二、奈良圭之輔、小口勝司、百瀬和享、樋口輝彦、上島国利：抗うつ薬による Frizzled-3 protein の発現の変化。第22回日本神経科学大会、大阪、1999。
- 山田光彦、山田美佐、木内祐二、奈良圭之輔、森信繁、百瀬和享、小口勝司、樋口輝彦、上島国利：抗うつ薬奏効機転に関与する機能的脳内分子探求の試み。第7回日本精神・行動遺伝研究会、仙台、1999。
- 山田光彦、山田美佐、木内祐二、奈良圭之輔、森信繁、百瀬和享、小口勝司、樋口輝彦、上島国利：RNA fingerprint法による抗うつ薬関連遺伝子の探索。第18回躁うつ病の薬理生化学的研究懇話会、滋賀、1999。
- 森信 繁：脆弱性形成とCREBリン酸化-脱リン酸化機能（シンポジウム）。第21回日本生物学的精神医学会、仙台、1999。
- 藤巻康一郎、森信 繁、高橋道宏、大谷宏一、加藤進昌：抗うつ薬・ストレスの及ぶラット脳内 calcineurin mRNA発現への影響。第21回日本生物学的精神医学会、仙台、1999。
- 日域広昭、加賀谷有行、後藤信一郎、竹林実、小鶴俊郎、中江左知子、堀口淳、山脇成人：Dexamethasone慢性処置ラットにおけるLi2CO3の影響—細胞内カルシウムに関する検討—。第21回日本生物学的精神医学会、仙台、1999。
- 片桐秀晃、加賀谷有行、小鶴俊郎、日域広昭、中江左知子、三好出、稲垣正俊、後藤信一郎、田原康孝、堀口淳、山脇成人：Dexamethasone処置への calcium channel拮抗薬nimodipineによるwet dog shakes behaviorsにおよぼす影響。第21回日本生物学的精神医学会、仙台、1999。
- 三好出、加賀谷有行、田原康孝、稲垣正俊、日域広昭、小鶴俊郎、片桐秀晃、竹林実、堀口淳、山脇成人：グリオーマ由来培養細胞におけるセロトニン刺激性細胞内カルシウム動員系の脱感作—セロトニン及びDOIによる検討—。第21回日本生物学的精神医学会、仙台、1999。
- 竹林実、加賀谷有行、稲垣正俊、三好出、片桐秀晃、岡本泰昌、堀口淳、山脇成人：ラットC6BU-1細胞におけるdehydroepiandrosteroneのcyclic GMP産生に対する効果。第42回日本神経化学会、広島、1999。
- 加賀谷有行、岡田亜希子、田原康孝、稲垣正俊、三好出、岡本泰昌、竹林実、堀口淳、仲田義啓、山脇成人：グリア由来培養細胞におけるトロンピン刺激性細胞内カルシウム動員系に対するリチウムとプラスミンの影響。第42回日本神経化学会、広島、1999。
- 岡本泰昌、加賀谷有行、日域広昭、田村達辞、福本拓治、竹林実、前正秀宣、西田朗、堀口淳、山脇成人：慢性リチウム投与のラット海馬スライスにおけるノルアドレナリン刺激性細胞内カルシウム反応に対する抑制効果。第42回日本神経化学会、広島、1999。
- Hashimoto, E., Sohma, H., Shirasaka, T., Ozawa H. and Saito, T.: Alterations of the mRNA levels of adenylyl cyclase and G protein in alcoholics.

The 7th Congress of the European Society for Biomedical Research on Alcoholism, Barcelona, 1999.

Saito, T., Sohma, H., Hashimoto, E., Ozawa H., Ikeda, H. and Ashizawa, T.: Alterations of the messages of type I and type VIII adenylyl cyclases, and Gs-protein α -subunit in alcoholics. 22nd Annual Scientific Meeting of the Research Society on Alcoholism, Santa Barbara, 1999.

根本麻理子、久保田信雄、大滝博和、塩田清二、小口勝司、木内祐二：グリアセロトニントランスポーターのストレス反応性の発現増加。第73会日本薬理学会年会、横浜、2000。

山田美佐、山田光彦、山崎諭、木内祐二、小澤寛樹、百瀬和享、上島国利、樋口輝彦：Ring-H2 finger モチーフを有する新規抗うつ薬関連遺伝子の同定。第73会日本薬理学会年会、横浜、2000。

山崎諭、山田美佐、山田光彦、樋口輝彦、百瀬和享：抗うつ薬長期投与によるラット脳内新規Rho-kinaseの発現の変化。第73会日本薬理学会年会、横浜、2000。

山田光彦、山田美佐、山崎諭、木内祐二、小澤寛樹、百瀬和享、上島国利、樋口輝彦：抗うつ薬慢性投与後のring finger motifを有するラット新規転写調節因子発現の変化。第22回生物学的精神医学会、東京、2000。

山田光彦、山田美佐、山崎諭、奈良圭之輔、木内祐二、小口勝司、百瀬和享、上島国利、樋口輝彦：抗うつ薬関連遺伝子をスポットしたcDNA microarrayの開発。第8回日本精神・行動遺伝研究会、横浜、2000。

研究要旨: これまでに我々は、抗うつ薬長期投与後にラット脳内において発現が変化する遺伝子を、RNA fingerprint 法を用いて同定してきた (antidepressant-related gene: ADRG1-200)。これまで、抗うつ薬投与における発現の変化を1つずつのクローンについて Northern Blotting、RT-PCR法により、再確認してきたが、今回この過程の効率化をはかるため、ADRG1-200、house keeping genes 及びネガティブコントロールをスポットした独自の cDNA microarray (ADRG-microarray) を開発した。この ADRG-microarray を用いることにより、発現レベルの再確認、定量化を同時に大量に検討することが可能となった。その結果、ラット前頭葉皮質、視床下部において抗うつ薬の連続投与後に多岐にわたる遺伝子群の発現が変化している可能性が強く示された。今回、我々が開発を進めた ADRG-microarray は、抗うつ薬、他のうつ病治療法、種々のモデル動物での大量の候補遺伝子発現の変化を効率良くスクリーニングすることのできる強力なツールとなると考えられた。また、本研究アプローチによりうつ病の病因やその治癒機転と関連する未知も含めた病態特異的遺伝子を探索しその生体機能を解析するための基盤的知見が得られることが強く示唆された。

A. 研究目的

うつ病の病因究明は病態モデル理論を実験的に検証することにより進められてきたが、現在でもうつ病の発症機序と治癒機転の基盤となる神経化学的变化は明らかではない。そこで本研究では、これまでの病態モデル理論にとらわれることなく、RNA fingerprint 法によりうつ病の病因やその治癒機転と関連する病態特異的遺伝子の発現を探索しその生体機能を解析することを目的とした。

B. 研究方法

雄性SDラット腹腔内に三環系抗うつ薬のイミプラミン又は選択的セロトニン再取り込み阻害薬のサートラリンを5mg及び10mg 1日1回21日間連続投与し、脳内各部位を摘出し total RNA を抽出した。次に、逆転写反応を行い cDNA を合成しこれを鋳型とし³²P-dATP を用いて任意の配列からなるプライマー (5'側10種、3'側9種) を組み合わせ PCR を行い、変性アクリルアミドゲルを用いて電気泳動しRNA fingerprint を検出した (RNA fingerprint 法)。投与群において特異的に増加しているバンドの cDNA を回収し、これらの cDNA を TA クローニングベクターに挿入しサブクローニングを行った。これまでに約200種の抗うつ薬の奏効機転に関連すると考えられる遺伝子 ADRG1-200 (antidepressant related gene) の塩基配列を決定し同源性検索を行った。

続いて、これら ADRG1-200、house keeping genes 及びネガティブコントロールをスライドガラス上にスポットし、独自の cDNA microarray (ADRG-microarray) を開発した。コントロール及びサートラリン投与群各3匹のラット前頭葉皮質を混合し mRNA を抽出し、それぞれ、Cy3、Cy5-dUTP 存在下逆転写反応を行い cDNA 蛍光プローブを作製した。これらを ADRG-microarray と競合的にハイブリダイゼーションさせ、各スポット上の蛍光強度の比 (Cy3/Cy5) より発現の差を測定した。このステップにより発現の増減が再確認されたクローンの遺伝子発現の特異性を Northern Blot 法、Ribonuclease Protection Assay (RPA) 法もしくは RT-PCR 法により順次、定量的解析を行った。また未知遺伝子と確認された

場合には、その全塩基配列を RACE 法により決定した。さらに、脳各部位より蛋白を抽出し、抗体を用いて Western Blotting 法により発現の変化を蛋白レベルで検討した。

C. 研究結果

これまでの研究で、対照群に比べ2種の抗うつ薬の連続投与後に共通して特異的に増減しているバンドを確認し、これよりサブクローニングを行い、約200のクローンを得た (Antidepressant related gene: ADRG 1-200)。それらの塩基配列を決定し同源性検索を行ったところ、未知遺伝子 (EST) と考えられたクローンが全体の約60%であった。本年度我々は、これら ADRG1-200、housekeeping genes 及びネガティブコントロールをスライドガラス上にスポットし、独自の cDNA microarray (ADRG-microarray) を開発し、各スポット上におけるコントロール/薬物投与群の蛍光強度の比 (Cy3/Cy5) より発現の差を測定した。その結果、ラット前頭葉皮質、視床下部において抗うつ薬の連続投与後に多岐にわたる遺伝子群の発現が変化している可能性が推測された。これらのうち、既知遺伝子との同源性が高かったものを機能別に分類すると (1) 受容体及び細胞内情報伝達系 (2) タンパク質折り畳みと輸送 (3) 細胞障害・酸化還元系クローン (4) 神経特異的に発現するクローン (5) その他であった。

ADRG-microarray の解析の結果、特に ADRG-30 及び -34 は、シグナル強度が強く、さらに、抗うつ薬投与により発現が著しく変化していることが明らかとなり、詳細な検討を続けている。

ADRG-30は、神経終末のカルシウムチャネルの抑制に不可欠である cysteine string protein mRNA と 96.4% のホモロジーを示した。ADRG-microarray の解析の結果、サートラリン投与群の前頭葉皮質でコントロールの2.30倍の発現量の増加が認められ、さらに特異的プライマーを用いた RT-PCR 法により、発現が増加していることが確認された。現在、抗体の供与を受け、蛋白レベルでの検討及びうつ病患者死後脳における発現を検討中で

ある。一方、ADRG-34 は、RNA fingerprint 法により得られたフラグメントが、マウス kf-1 と 95.7% のホモロジーを示した。RACE 法により全塩基配列を決定したところ、これまでに発表されていないラット kf-1 であると考えられた。ADRG-microarray の解析の結果、サートラリン投与群の前頭葉皮質でコントロールの2.17倍の発現量の増加が認められた。脳の各部位における特異的プライマーを用いた RT-PCR 法により、前頭葉皮質及び海馬で発現が増加していることが確認されたが、視床下部では変化していなかった。現在、抗体を作製し、蛋白レベルでの検討及びうつ病患者死後脳における発現を検討中である。

D. 考察

これまで、RNA fingerprinting 法により、うつ病の病因及びその治癒機転と関連する病態特異的タンパク質の発現を遺伝子レベルで探索してきた。これまで我々は、抗うつ薬投与における発現の変化を1つずつのクローンについて Northern Blotting、RT-PCR 法により再確認、定量してきたが、今回この過程の効率化をはかるため、ADRG-microarray を開発した。ADRG-microarray を用いた解析の結果は、ADRG-30 及び-34 の特異的プライマーを用いた RT-PCR の結果と同様な結果が得られたことより、我々が開発した ADRG-microarray を用いることより、発現レベルの再確認、定量化を同時に大量に検討できることが確認された。さらにこの ADRG-microarray は、抗うつ薬、他のうつ病治療法、種々のモデル動物での大量の候補遺伝子発現の変化を効率良くスクリーニングすることのできる強力なツールとなると考えられた。

ADRG-microarray の解析の結果、抗うつ薬投与により発現が著しく変化していることが明らかとなった ADRG-34 の全塩基配列を決定し予想されるアミノ酸のモチーフ検索を行ったところ、Zinc finger family の一つである Ring-H2 finger モチーフを有することが明らかとなった。Ring-H2 finger モチーフは、Zinc finger の変形モチーフとして報告され、細胞内の機能調節や分化に関連した核内蛋白質中でファミリーを形成していることが報告されている (Freemont et al., 1993, Inoue et al., 1993)。Zinc finger モチーフは、TFIIIA のDNA 結合モチーフとして提唱されて以来、sp1、核内レセプター群、GATA 因子群、癌遺伝子産物 ErbA など、200 種以上の転写因子中に見出されている。今後 ADRG-34 遺伝子の発現制御機構について検討し、さらに本遺伝子が関与する生理機能（特に転写制御機構）について検討予定である。

E. 結論

本年度我々は、抗うつ薬投与により発現が増減していたクローン(ADRG1-200)、house keeping genes 及びネガティブコントロールをスライドガラス上にスポットした独自の cDNA microarray (ADRG-microarray) を開発し解析を行った。その結果、ラット前頭葉皮質、視床下部において抗うつ薬の連続投与後に多岐にわたる遺伝子

群の発現が変化している可能性が推測された。この ADRG-microarray を用いることにより、発現レベルの再確認、定量化を同時に大量に検討できることが確認され、さらに、抗うつ薬、他のうつ病治療法、種々のモデル動物での大量の候補遺伝子発現の変化を効率良くスクリーニングすることのできる強力なツールとなると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Yamada, M., Yamada, M., Kiuchi, Y, Nara, K, Kanda, Y, Morinobu, S, Momose, K, Oguchi, K, Kamijima, K, Higuchi, T : Identification of a novel splice variant of heat shock cognate protein 70 after chronic antidepressant treatment in rat frontal cortex. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 62, 375-380, 1999

2. 学会発表

Yamada, M., Yamada, M., Yamazaki, S., Kiuchi, Y, Ozawa, K, Momose, K, Kamijima, K. and Higuchi, T. : Identification of an antidepressant related gene with ring-H2 finger motif in rat brain. 第73回薬理学会年会, 2000

Yamazaki, S., Yamada, M., Yamada M., Higuchi, T. and Momose, K. : Differential expression of a novel Rho-kinase homologue after chronic antidepressant treatment in rat brain. 第73回薬理学会年会, 2000

山田光彦, 山田美佐, 山崎諭, 木内祐二, 小澤寛樹, 百瀬和享, 上島国利, 樋口輝彦 : 抗うつ薬慢性投与後の ring finger motif を有するラット新規転写調節因子発現の変化, 第22回生物学的精神医学会, 2000

山田光彦, 山田美佐, 山崎諭, 奈良圭之輔, 木内祐二, 小口勝司, 百瀬和享, 上島国利, 樋口輝彦 : 抗うつ薬関連遺伝子をスポットしたcDNA microarray の開発, 第8回日本精神・行動遺伝学研究会, 2000

Yamada, M., Yamada, M., Kiuchi, Y, Nara, K., Momose, K, Oguchi, K, Kamijima, K. and Higuchi, T. : Differential expression of a novel splice variant of heat shock cognate protein 70 after chronic antidepressant treatment in rat frontal cortex. *Neuroscience Meeting*, 1999

山田光彦, 山田美佐, 木内祐二, 奈良圭之輔, 森信繁, 百瀬和享, 小口勝司, 樋口輝彦, 上島国利 : 抗うつ薬長期投与による HSC49 の発現とその構造, 第29回日本神経精神薬理学会, 1999

山田光彦, 山田美佐, 木内祐二, 奈良圭之輔, 小口勝司, 百瀬和享, 樋口輝彦, 上島国利 : 抗うつ薬による Frizzled-3 protein の発現の変化, 第22回日本神経科学大会, 1999

山田光彦, 山田美佐, 木内祐二, 奈良圭之輔, 森信繁, 百瀬和享, 小口勝司, 樋口輝彦, 上島国利 : RNA fingerprint 法による抗うつ薬関連遺伝子の探索, 第18回躁うつ病の薬理生化学的研究懇話会, 1999

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 グリア細胞に発現するモノアミントランスポーターの同定を試み、さらにストレス負荷時の機能変化について検討を行った。正常ヒトアストロサイト (NHA) 及び各種ヒトグリオーマ由来培養細胞には既知のモノアミントランスポーターのうちセロトニントランスポーター (5-HTT) が発現しセロトニン取り込みを行っていることが示された。ストレス関連栄養因子である塩基性線維芽細胞栄養因子 (bFGF) 添加によりNHAの5-HTT発現が増加した。また、in vivoではラット中大脳動脈閉塞脳後に脳虚血周辺部でbFGFと5-HTT発現が増加し、SSRIのサートラリン前処理時には虚血後の脳梗塞巣が増大した。以上よりグリア細胞に発現増大する5-HTTは過剰に放出されるセロトニンを除去しその興奮毒性から神経細胞を防御している可能性が示唆された。

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 Na^+/Cl^- 依存的なモノアミン取り込みの抑制作用を示すため、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た。モノアミントランスポーターは神経終末に局在すると考えられていたが、近年、グリア細胞にも Na^+/Cl^- 依存性のモノアミン取り込み機構が存在し (uptake 2)、抗うつ薬によりその取り込み機能が抑制されることも明らかになってきたが、その分子の実態はいまだ不明であった。神経機能の恒常性維持に大きく関与することが知られるグリア細胞に発現するモノアミン取り込み機構の詳細を検討することは抗うつ薬の奏効機転解明の一助となると考え、本年度はグリア細胞に発現するモノアミントランスポーターの同定を試み、さらにストレス負荷時の機能変化について検討を行った。

B. 研究方法

(1) ヒトグリア細胞に発現するモノアミントランスポーターの同定と栄養因子依存性調節機構の解明

ヒトグリア細胞に発現するモノアミントランスポーターをスクリーニングするために、市販の胎児脳由来培養NHAおよびヒトグリオーマ由来培養細胞よりtotal RNAを抽出し、既知のセロトニン、ノルアドレナリン及びドパミントランスポーター (5-HTT, NAT, DAT)、有機カチオントランスポーター (OCT, OCT1) の特異的プライマーを用いRT-PCR法でmRNAの検出を試み、さらにcDNA全長の塩基配列解析を行った。

また、上記培養細胞にストレス関連栄養因子 (EGF, bFGF) を2日間添加後、 ^3H セロトニン取り込み能と遺伝子発現量の変化を検討した。

(2) 脳虚血ラットの脳梗塞病巣に対するモノアミントランスポーターの関与の検討

代表的なストレスモデルとしてラット脳虚血モデル (一側中大脳動脈電気凝固) を作成し1-7日後に梗塞部位及び周辺部 (大脳皮質、線条体) からtotal RNAを抽出し、モノアミントランスポーター及びbFGFのmRNA発現の経時変化を検討した。さらにこの脳虚血モデルを用い抗うつ薬前処理 (24及び1時間前に10 mg/kg腹腔内投与) の脳梗塞領域に及ぼす影響を検討した。

(倫理面への配慮) 動物実験は動物愛護上十分な配慮をし、National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animalに準拠した実験プロトコールに基づき、倫理性と科学性に十分配慮して実施した。

C. 研究結果

(1) NHAでは検討したトランスポーターmRNAのうち5-HTTのみがRT-PCRで検出された。ヒトグリオーマ由来培養細胞KG-1-C, A172, KGKでも同様な結果が得られた。このPCR産物から5' RACE, 3' RACE法を用いてmRNAの全長を決定したところ、ヒト神経に発現する既知の5-HTTと完全に一致した。

NHAではbFGFを2日間添加後に ^3H セロトニン取り込み能の著明な増大が認められたが、EGFの影響は認められなかった。またA172ではいずれの栄養因子の影響も明らかでなかった。

次いで、NHAの5-HTT 遺伝子発現に及ぼすbFGF, EGF 2日間添加の影響をRT-PCR法で検討したところbFGFでは10-100 ng/ml, EGFでは20-50 ng/mlの範囲で5-HTT mRNA発現量の著明な増大が認められ、同様な結果がノザンプロットでも確認された。一方、ヒトグリオーマ由来細胞のA172, KGKではEGF,

bFGFの5-HTT mRNA発現促進作用は認められなかった。なお、NHAにEGF, bFGFのレセプター (EGFR, FGFR1, FGFR2) が発現していることはRT-PCRで確認した。

(2) ラット脳虚血モデルの梗塞部位周辺部 (線条体) の5-HTTおよびbFGFのmRNA発現は、両者ともに1日後をピークに増加が認められた。セロトニン選択的再取り込み阻害薬 (SSRI) のサートラリン前処理で脳虚血24時間後の脳梗塞巣断面積は有意に増加したが、三環系抗うつ薬デシプラミンでは脳梗塞巣に影響はなかった。

D. 考察

今回、我々は抗うつ薬の作用部位であるモノアミントランスポーターがグリア細胞にも存在する可能性を検討し、神経細胞で同定されたものと同一の5-HTTが胎児由来の初代培養アストロサイト、グリオーマ由来細胞種のいずれにおいても発現していることを明らかにした。

グリア細胞は虚血をはじめとする神経系に対する様々なストレスに対して防御的に働くことが知られており、その際にはbFGF、EGFなどのストレス関連の栄養因子が深く関与することが報告されている。今回の検討で、bFGFはグリア細胞の5-HTT発現を著明に増加させ、また、in vivoでも脳虚血モデルで虚血周辺部でbFGFおよび5-HTTのmRNA発現を増加させることが明らかになった。このことより、ストレス時にはbFGFを介してグリア細胞の5-HTT発現、セロトニン取り込みが増加する可能性が示された。一方、グリオーマ由来細胞では、bFGFを介した5-HTT発現調節系が破綻している可能性が示された。

今回の検討で、SSRIのサートラリン前処理時には脳梗塞巣が増大することが示された。虚血時などで大量に放出されるセロトニンは神経細胞に対して興奮毒性を示すことから、グリア細胞の5-HTT発現増加の病態生理的意義としては、セロトニンの取り込みを増大することでその興奮毒性から神経細胞を保護しているものと思われる。以上の結果は、高齢者など脳血管障害のリスクの高い患者へのSSRI使用に対して注意を要することを示唆しており、今後の臨床的な検討が望まれる。

不安をはじめとする各種の情動を調節するセロトニンはうつ病の病因に深く関与すると考えられている。そのため神経細胞に加えグリア細胞の5-HTTも抗うつ薬の作用機転やうつ病の発症機序に関与する可能性もあり、今後検討を加える予定である。

E. 結論

ヒト培養グリア細胞には既知のモノアミントランスポーターのうち5-HTTが発現しセロトニン取り込みを行っていることが示された。bFGFにより培養グリア細胞での5-HTT発現が増加し、in vivoではラットの脳虚血後に虚血周辺部で5-HTT発現が増加した。SSRIであるサートラリン前処理時には虚血後の脳梗塞巣が増大したことより、グリア細胞に発現増大する5-HTTは過剰に放出されるセロトニンを除去しその興奮毒性から神経細胞を防御している可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文

Kubota, N., Kiuchi, Y., Namoto, M., Oyamada, H., Ohno, M. and Oguchi, K.: Regulation of serotonin transporter gene expression in human glial cells by growth factors. *Eur. J. Pharmacol.* (in submission)

Yamada, M., Yamada, M., Kiuchi, Y., Nara, K., Kanda, Y., Morinobu, S., Momose, K., Oguchi, K., Kamijima, K. and Higuchi, T.: Identification of a novel splice variant of heat shock cognate protein 70 after chronic antidepressant treatment in rat frontal cortex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 261(2): 541-545, 1999.

2. 学会

久保田信雄、木内祐二、小山田英人、根本麻理子、大野稔、小口勝司. ヒトグリア細胞に発現するノモノアミントランスポーターの解析. 第72会日本薬理学会年会、札幌、3月、1999.

Yamada, M., Yamada, M., Kiuchi, Y., Nara, K., Momose, K., Oguchi, K., Kamijima, K. and Higuchi, T.: Differential expression of a novel splice variant of heat shock cognate protein 70 after chronic antidepressant treatment in rat frontal cortex. *Neuroscience Meeting, Miami, October, 1999.*

山田美佐、山田光彦、木内祐二、奈良圭之輔、百瀬和享、小口勝司、上島国利、樋口輝彦: ラット前頭皮質における抗うつ薬関連遺伝子の特異的発現について. 第72会日本薬理学会年会、札幌、3月、1999.

根本麻理子、久保田信雄、大滝博和、塩田清二、小口勝司、木内祐二. グリアセロトニントランスポーターのストレス反応性の発現増加. 第73会日本薬理学会年会、札幌、3月、2000.

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 国立精神・神経センター国府台病院

研究要旨

気分障害の成因と治療にとってセロトニン (5-HT) -2A受容体～細胞内情報伝達系が何らかの役割を担っていると考えていることから、本年度はラットに5-HT-2A受容体機能亢進状態を誘導し、これに気分安定薬などがどのような影響を及ぼすか検討した。5-HT-2A受容体機能亢進に対していくつかの感情障害治療薬が改善効果を示したが、その作用部位は細胞内情報伝達系にある可能性が考えられた。

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

これまでに血小板におけるセロトニン (5-HT) -2A受容体を介した細胞内カルシウム濃度上昇が大うつ病および双極性躁うつ病で亢進していること、躁病における細胞内カルシウム動員の亢進は治療薬リチウム服用中の患者では見られないことを報告しており、気分障害の成因と治療にとって5-HT-2A受容体～細胞内情報伝達系が何らかの役割を担っていると考えている。そこで、本年度はラットに5-HT-2A受容体機能亢進状態を誘導し、これに気分安定薬などがどのような影響を及ぼすか検討した。

B. 方法

1. Dexamethasone (Dex) 慢性処置後の5-HT-2A受容体および細胞内情報伝達系

5～6週齢のWistar系雄性ラットをcontrol群、Dex処置群の2群に分け、Dex処置群にはDex (1mg/kg/day, s.c.) を14日間処置した。

(1) 最終処置の約24時間後に5-HT-2A受容体作動薬である(±)-1-(2,5-dimethoxy-4 iodophenyl)-2-aminopropane (DOI) (1 mg/kg, s.c.) 誘発性のwet dog shake (WDS) を観察した。

(2) 最終処置の約24時間後に断頭により大脳皮質を取り出して粗膜画分を調整し、5-HT-2A受容体結合能 [³H]-ketanserin binding を測定した。

(3) 最終処置の約24時間後に断頭により大脳皮質あるいは全脳を取り出してphospholipase C、Gq-

GTP binding protein、inositol-1,4,5-trisphosphate receptorの発現量を各々に対する特異抗体を用いてWestern blottingにより測定した。

(4) 最終処置の約24時間後に海馬領域を含む冠状断スライスを作成し、蛍光Ca感受性色素であるfura-2/AMを負荷し、画像処理解析装置を用いてcortex、CA1、CA3、dentate gyrus (DG) における[Ca²⁺]_iを算出し、KCl刺激性 (50mM, 2min) [Ca²⁺]_i変化を2群間で比較した。

2. Dex慢性処置による5-HT-2A受容体機能亢進に対する電撃、リチウムおよびニモジピンの影響

(1) Dex 14日処置と同時に電撃を14日間処置し、その後の5-HT-2A受容体数、WDSおよびphospholipase C、Gq-GTP binding protein、inositol-1,4,5-trisphosphate receptorの発現量を観察した。

(2) Dex 14日処置と同時にリチウム3 mEq/kgを14日間処置し、その後の5-HT-2A受容体数、WDSおよびKCl刺激性 (50mM, 2min) [Ca²⁺]_i変化を観察した。

(3) Dex 14日処置と同時にニモジピン5 mg/kgを14日間処置し、その後の5-HT-2A受容体数およびWDSを観察した。

C. 研究結果

1. Dex慢性処置後の5-HT-2A受容体および細胞内情報伝達系

(1) DOI誘発性WDSはDex反復処置ラットで有意に亢進していた。

(2) 5-HT-2A受容体数はDex反復処置ラットで有意に亢進していた。

(3) phospholipase C、Gq、inositol-1,4,5-

trisphosphate receptor量はDexにより変化しなかった。

(4) KCl刺激性 $[Ca^{2+}]_i$ 変化はDex処置群で亢進していた。

2. Dex慢性処置による5-HT-2A受容体機能亢進に対する電撃、リチウムおよびニモジピンの影響

(1) 電撃によりWDS亢進は改善したが、その他は無影響だった。

(2) リチウム慢性処置により、WDSおよび $[Ca^{2+}]_i$ 変化が改善した。

(3) ニモジピン慢性処置によりWDS亢進が改善した。

D. 考察

1. Dex慢性処置後の5-HT-2A受容体および細胞内情報伝達系

Dex反復処置によりWDS、5-HT-2A受容体密度が増加していたが、phospholipase C、Gq、inositol-1,4,5-trisphosphate receptorといった蛋白量は変化してなかったことから、Dex処置によるWDSの増強は、主に受容体の変化によることが示唆された。しかし、KCl刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 変化も亢進していたことから、5-HT-2A受容体以外の機序による亢進も考慮する必要がある。または、 $[Ca^{2+}]_i$ 変化の亢進は、WDSの増強とは独立したものかもしれない。

2. Dex慢性処置による5-HT-2A受容体機能亢進に対する電撃、リチウムおよびニモジピンの影響

電撃、リチウムおよびニモジピンともに受容体数を変化させることなくWDSの亢進を改善したことから、これらの改善作用は細胞内情報伝達系の変化によるものと考えられた。しかし、phospholipase C、Gq、inositol-1,4,5-trisphosphate receptor量に変化が見られなかったことから、これら以外の細胞伝達系の発現変化、あるいはこれら蛋白の機能変化を検討する必要がある。

E. 結論

5-HT-2A受容体機能亢進に対していくつかの感情障害治療薬が改善効果を示したが、その作用部位は細胞内情報伝達系にある可能性が考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

T. Hayashi, T.-P. Su, A. Kagaya, A. Nishida, M. Shimizu and S. Yamawaki (1999) Neuroleptics with differential affinities 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 31; 20-28
M. Inagaki, A. Kagaya, M. Takebayashi, J. Horiguchi, and S. Yamawaki. (1999) 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. 106; 23-33.

Yu. Okamoto, Y. Okamoto, A. Kagaya, J. Horiguchi and S. Yamawaki. (1999) The relationship of the platelet 5-HT-induced calcium response to clinical symptoms in eating disorders. Psychopharmacol. 142; 289-294.

H. Jitsuiki, A. Kagaya, S. Goto, J. Horiguchi and S. Yamawaki. (2000) The effect of lithium carbonate on the enhancement of serotonin-2A receptor elicited by dexamethasone. Neuropsychobiology 41: 55-61.

A. Kagaya, A. Okada, Y. Tawara, M. Inagaki, H. Jitsuiki, T. Kozuru, I. Miyoshi, H. Katagiri, Y. Uchitomi, J. Horiguchi, Y. Nakata and S. Yamawaki. (2000) Lithium chloride inhibits thrombin-induced intracellular calcium mobilization in C6 glioma cells. Prog. Neuro-Psychopharmacol. & Biol. Psychiat. 24; 85-95.

T. Kozuru, A. Kagaya, M. Takebayashi, J. Horiguchi and S. Yamawaki. (2000) Chronic electroconvulsive shock decreases (+)-1-(4-iodo-2,5-dimethoxyphenyl)-2-aminopropane hydrochloride (DOI)-induced wet-dog shake behaviors of dexamethasone-treated rats. Life Sci. (in press)

M. Takebayashi, A. Kagaya, M. Inagaki, T. Kozuru, H. Jitsuiki, K. Kurata, Y. Okamoto and S. Yamawaki. (2000) 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)

A. Kagaya, A. Okada, H. Jitsuiki, Y. Tawara, M. Inagaki,

M.Takebayashi, T.Saeki, A.Nishida,
Y.Nakata and S.Yamawaki (2000)
Effect of heat stress on
serotonin-2A receptor-mediated
intracellular calcium mobilization
in rat C6 glioma cells. J. Neural
Transm. (in press)

A.Kagaya, A.Kugaya, M.Takebayashi,
M.Fukue-Saeki, T.Saeki, S.Yamawaki
and Y.Uchitomi (2000) Plasma
concentrations of interleukin-1b,
interleukin-6, soluble
interleukin-2 receptor and tumor
necrosis factor-a of depressed
patients in Japan.
Neuropsychobiol. (in press).

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 広島大学医学部神経精神医学教室 助教授

研究要旨：うつ病の発症機序及び抗うつ薬の作用機序として重要である、転写因子 cAMP response element binding protein (CREB)の活性化—不活化バランスに関する分子生物学的研究をラット脳を対象として行い、以下の成果を上げた。1) 抗うつ薬(paroxetine; PRX)慢性投与にて有意な CREB リン酸化の変動はみられず、慢性+急性投与では急性投与によって引き起こされていた CREB リン酸化亢進が抑制されていた。2) PRX 慢性投与後に急性拘束ストレスを負荷したところ、急性ストレス単回負荷でみられた CREB リン酸化亢進が抑制されていた。3) 急性拘束ストレスによって海馬 CA1 領域の、calcineurin (CaN) mRNA 発現の有意な減少がみられた。4) 急性拘束ストレスによって CaN 活性が有意に亢進した。5) 抗うつ薬 (PRX, imipramine)急性・慢性投与によって、CaN 活性は有意に亢進する。6) これらの研究結果は抗うつ薬の作用機序として、以下の薬理作用が重要であることを示唆している。a) 抗うつ薬慢性投与によって新たな細胞外刺激による CREB リン酸化を抑制する、b) ストレスによって亢進した CREB リン酸化の脱リン酸化を、抗うつ薬は促進する。

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。昨年度までに分担研究者らは、ストレスによってラット脳内で転写因子 cAMP response element binding protein (CREB) のリン酸化が亢進し、ストレス脆弱個体では耐性個体と比べてストレスによる CREB リン

ン酸化が亢進していることを明かとした。同時に抗うつ薬急性投与でも、CREB リン酸化が亢進していることを報告した。また、リン酸化 CREB(p-CREB)を脱リン酸化する calcineurin (CaN)のストレスによる発現変動を Northern blot 法で検討したが、有意な発現上の変化はみられなかった。従って本年度の研究の目的は、ストレスによって亢進した p-CREB 発現の脱リン酸化作用が、抗うつ効果と関連している可能性を解明する点にある。

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。抗うつ薬 paroxetine (PRX)投与は 7.5 mg/kg を、

imipramine (IMP)は 15 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 A α 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。CaN の脱リン酸化能である serine/threonine phosphatase 活性は、protein phosphatase 群の基質として特異的な phosphopeptide (PP)を用いて、CaN の反応に適した反応液条件下での PP 分解による free phosphatase の量を測定する方法で行った。脳組織の蛋白量は、Bio-Rad Protein Assay 法で行った。

C. 研究結果

1) 慢性及び慢性+急性 PRX 投与によるラット脳内 CREB リン酸化への影響

昨年度の研究から、PRX 急性投与(30分後)で有意なラット大脳皮質前頭部・海馬内の CREB リン酸化亢進が得られているため、本年度は慢性及び慢性+急性 PRX 投与によるラット脳内 CREB リン酸化への影響を検討した。慢性(14日間)投与後で最終投与から 24 時間経過した時点での CREB リン酸化を検討したが、対照群と比べて有意な変化はみられなかった。慢性投与後で最終投与から 30 分後の時点(慢性+急性)での CREB リン酸化を検討したが、対照群と比べて有意な変化はみられなかった。

2) 急性拘束ストレスによるラット脳内 CREB リン酸化への慢性 PRX 前投与の影響

急性拘束ストレス(45分間)負荷で、ラット大脳皮質前頭部・海馬内の CREB リン酸化が有意に亢進することを、これまでの研究から報告してきた。そこで今回は慢性(14日間)に PRX を前投与し、最終投与 30 分後から急性拘束ストレスを負荷することで、PRX 前投与のストレス性 p-CREB 発現亢進への効果を検討した。その結果、急性拘束ストレス

でこれまでみられていた有意な p-CREB 発現の亢進は、PRX 慢性前投与群では検出されなかった。

3) 急性ストレスによる海馬 CaN mRNA 発現への影響

昨年度は Northern blot 法を用いて急性拘束ストレス(45分間)による、ラット大脳皮質前頭部・海馬内の CaN mRNA 発現を測定したが、有意な発現の変化はみられなかった。本年度は海馬局所の CaN mRNA 発現を測定する目的で、*in situ* hybridization 法を用いて実験を行った。その結果、急性ストレスによって CA1 の錐体細胞層で発現に、有意な低下を検出した。

4) 急性ストレスによるラット脳内 CaN 活性への影響

これまでの検討から p-CREB の脱リン酸化に重要な酵素である CaN の発現は、急性ストレスによってほとんど変動しないことが明らかとなったので、本年度は CaN の serine/threonine phosphatase 活性への急性ストレスへの影響を測定した。ラット大脳皮質前頭部では、拘束ストレス 15, 45, 90 分間の各条件下で有意な CaN 活性の亢進がみられた。海馬では、拘束ストレス 45, 90 分間の各条件下で有意な CaN 活性の亢進がみられた。

5) 抗うつ薬投与によるラット脳内 CaN 活性への影響

これまでの検討から CaN の発現は、急性・慢性抗うつ薬投与によって変動しないことが明らかとなったので、本年度は CaN の serine/threonine phosphatase 活性への急性・慢性抗うつ薬投与の影響を測定した。急性 PRX 及び IMP 投与による CaN 活性への効果をラット大脳皮質前頭部・海馬で検討したところ、両抗うつ薬とも投与後 1 時間の時点では CaN 活性を有意に亢進させたが、投与後 2 時間の時点では有意な変化を引き起こしていないことが示された。慢性(14日間)投与後最終投与 1 時間の時点で、PRX, IMP 投与の CaN 活性に及ぼす影響を検討したところ、単回投与実験でみられたのと同様に有意な CaN 活性