

の亢進がみられた。

D. 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転写因子 p-CREB 発現亢進による遺伝子転写活性化が密接に関連していると推測されている。本分担研究者らは昨年度までの研究によって、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すと同時に、急性抗うつ薬(PRX)投与が脳内 CREB リン酸化を促進する作用もつことを明らかとした。このような結果は、PRX がストレスと同じく核内で CREB リン酸化に直接影響することを示していた。しかしながら急性実験での結果は、ストレス負荷も抗うつ薬投与も CREB リン酸化を亢進させており、急性抗うつ薬投与がストレスによる遺伝子発現を抑制する可能性を否定する結果であった。このためまず本年度は、抗うつ効果が慢性投与後に出現してくる事実に着目して、抗うつ薬 PRX の慢性投与による脳内 CREB リン酸化への影響を検討してみた。

その結果、慢性 PRX 投与によって最終投与 30 分後、24 時間後で、有意な脳内 CREB リン酸化の亢進は得られないことが判明した。この結果は、単回 PRX 投与時にみられた投与後 30 分での有意な CREB リン酸化が消失していることを表しており、慢性投与時には CREB リン酸化に関して急性投与時とは異なった情報伝達経路の形成されている可能性が考えられた。このため慢性 PRX 前投与による、急性ストレス性 CREB リン酸化亢進への影響を検討した。その結果、抗うつ薬慢性+急性投与実験でみられたように、慢性 PRX 前投与は急性拘束性 CREB リン酸化亢進を抑制していることが明らかとなった。このような結果を総合すると、抗うつ薬 PRX 慢性投与（急性投与では見られない）によって細胞内情報伝

達系の機能に変動が起こり、新たな細胞外刺激に伴う CREB リン酸化亢進を抑制する作用を発揮すると思われる。従ってこのような薬理作用が、抗うつ効果の発現と密接に関連している可能性もあると考えられる。

転写機能活性化に該当する CREB リン酸化に対して、p-CREB の脱リン酸化は転写機能不活化であるため、一連の細胞内情報伝達機能上この脱リン酸化も重要な機能と考えられる。昨年度の研究では、ストレスによる CREB リン酸化の亢進が、ストレスによる CaN 発現の低下を招き、脱リン酸化過程に障害を引き起こす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。そこで本年度はストレスや抗うつ薬による、CaN の serine/threonine phosphatase 活性の変動を検討して、CREB の転写機能抑制に関与するストレスや抗うつ薬の効果を検討した。

その結果、急性ストレス負荷・急性抗うつ薬(PRX, IMP)投与・慢性抗うつ薬(PRX, IMP)投与の条件下で、活性の亢進が得られていた。今回得られた CaN 活性亢進のメカニズムは、各種刺激に伴う細胞内カルシウム濃度の亢進によるカルモジュリン活性化を介した、活性の亢進を表していると思われる。このような結果は、抗うつ薬投与が細胞内カルシウム濃度増大を介して p-CREB 発現を抑制する方向に働いていることを示唆しており、ストレスによる遺伝子発現の変化を抑制していると考えられる。

本年度行った CREB リン酸化及び CaN 活性への研究を総合的にまとめて考察すると、以下のような結論が得られる。1) ストレスによる感情障害の発症機序に密接に関与している CREB リン酸化亢進に対して、抗うつ薬慢性投与は CREB リン酸化亢進を細胞内リン酸化酵素活性を変動させる形で抑制する。2) 抗うつ薬慢性投与は、CaN 活性化を介して p-CREB の脱リン酸化を促進させる。3) このような慢性抗うつ薬投与でみられる相加的な CREB リン酸化亢進の抑制が、抗うつ効果と

関連していることを示唆した点で本研究は画期的な研究と思われる。

E. 結論

本年度の研究成果から、以下の結論を得た。

- 1) 抗うつ薬 PRX 慢性+急性投与条件下では、単回急性投与時にみられた p-CREB の有意な発現亢進はみられなくなっていた。
- 2) 抗うつ薬 PRX 慢性前投与によって、急性拘束ストレス性 CREB リン酸化亢進は抑制された。
- 3) 急性拘束ストレスによって、海馬 CA1 錐体細胞層の CaN mRNA 発現が有意に減少していた。
- 4) 急性拘束ストレスによって、CaN 活性は有意に亢進していた。
- 5) 急性・慢性 PRX, IMP 投与によって、CaN 活性は有意に亢進していた。
- 6) 抗うつ薬の慢性投与によって、CREB リン酸化亢進を細胞内リン酸化酵素活性を変動させる形で抑制する作用や CaN 活性化を介した p-CREB の脱リン酸化を促進させる作用が働き、抗うつ効果を発揮すると予想される。

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* 72: 2198-2205, 1999.
- 2) K. Fujimaki, S. Morinobu et al., Administration of a cAMP phosphodiesterase 4 inhibitor enhances antidepressant-induction of BDNF mRNA in rat hippocampus. *Neuropsychopharmacol* 22: 42-51, 2000.
- 3) S. Morinobu et al., Regulation of phosphorylation of cyclic AMP response element-binding protein by paroxetine treatments. *Clin Neuropharmacol* (in press).
- 4) 高橋 淳、森信 繁 他 ラット脳内 calcineurin 活性に及ぼすストレス・抗うつ薬の影響。日本神経精神薬理雑誌 19: 387, 1999.
- 5) 藤巻康一郎、森信 繁 他 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。日本神経精神薬理雑誌 19: 388, 1999.

2. 学会発表

- 1) 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 1999, 3.
- 2) 藤巻康一郎 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 21 回日本生物学的精神医学会 1999, 3.
- 3) 高橋 淳 他 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 1999, 9.
- 4) 藤巻康一郎、森信 繁 他 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 1999, 9.

厚生省科学研究費補助金（脳科学研究事業）
平成11年度 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

うつ病における分子生化学的基盤として死後脳におけるアデニル酸シクラーゼ（AC）系とホスリパーゼC（PLC）系の変化を検討し、他の主要な精神神経疾患であるアルツハイマー病（AD）・慢性精神分裂病との共通性・相違を明らかにすることを目的とした。

うつ病患者死後脳の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の蛋白質質量増加に帰因すると推察されるCa²⁺調節性のcAMP産生機能の亢進が認められた。さらにうつ病群においてはcAMP産生機能の低下とこれに伴い転写因子である総・リン酸化CREBの低下が認められた。ADではI型AC量低下に伴うCa²⁺刺激性ACの減弱とリン酸化CREBのみの低下が認められた。精神分裂病においてはAC活性のEGTA存在下では基礎活性値、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Ca²⁺刺激性ACの亢進が認められた。従ってうつ病とADに関しては一部のcAMP産生機能は低下していることが共通しているが、Ca²⁺調節性による変化は異なっていた。一方慢性分裂病ではcAMP産生機能は増強が認められた。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。数種類の抗うつ薬が5HT刺激性IPsの産生を*in vitro*にて阻害した。これらは症候学的・薬理的に示唆されているうつ症状と精神分裂病の陰性症状との共通性の生化学的背景を推察させる所見と考えられた。

1. はじめに

ヒトの高次脳機能において情・知・意の心理的複合体を生物学的に捉える試みは脳神経科学の基本的解明課題である。そこで我々は情動障害である感情障害の病態を明らかにするため、情動障害としての慢性分裂病、記憶（知）障害としてのアルツハイマー病の死後脳を用いて情動・意欲・記憶と深く関与すると考えられている大脳皮質（前頭葉）においてcAMP及びIPs情報伝達系並びにそれと関連する転写因子の量・機能を検討した。

2. 方法

1) 対象

脳の摘出、分割、切り出し及び保存はGsell¹⁾らの方法に従った。単極性うつ病患者（DSM-IVのうつ病性障害の診断基準による11名、年齢68.6±3.5、死後凍結時間19.6±10.1）、精神分裂病（DSM-IVの診断基準による11名、年齢67.3±3.5、死後凍結時間10.8±3.1）、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、年齢79.0±3.0、死後凍結時間25.3±4.1）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。またAD（7名、年齢80.1±4.0、死後凍結時間42.8±6.6）に関しては年齢、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老齢対照群（7名、年齢77.1±4.1、死後凍結時間37.4±6.6）と比較した。

2) 膜標本作製

脳組織をHepes緩衝液（20 mM Hepes, 0.25 M sucrose, 0.3 mM PMSF, 1 mM DTT, 1 mM EGTA, 1 mM MgCl₂, pH 7.4）でホモジナイズ後、600 x g, 10分間遠心分離し、その上清を48,000 x g, 20分間遠心した。得られた沈渣を再度同様の操作で洗浄し、大脳皮質膜標本とした。膜標本は測定まで-80°Cで保存した。

3) AC活性測定

AC活性測定はHattaらの方法²⁾に従った。即ち、膜標本を100 µlの15 mM Hepes (pH7.5), 0.05 mM ATP, [³²P]-ATP (約10⁶ cpm/tube), 1 mM DTT, 0.05 mM cAMP, 5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 60 mM NaCl, 0.25 mg/ml BSA, 0.5 mM IBMX, 1 unit adenosine deaminase, 5 mM creatine phosphate 及び50 unit/ml creatine phosphokinaseを含む溶液中で、30°C, 10分間反応させた。内部標準として[³H]-cAMPを用い、生成された[³²P]-cAMPを分離後、放射活性を液体シンチレーションカウンターにて測定した。

4) PLC β 活性測定

PLC β 活性測定は Jope らの方法³⁾に従った。即ち、膜標本を 100 μ l の反応溶液 (10 mM Tris-maleate, 0.1 mM phosphatidylinositol (PI), [³H]-PI (約 10⁵ cpm/tube), 8 mM LiCl, 6 mM MgCl₂, 3 mM EGTA 及び 1 mM sodium deoxycholate, pH 6.4) 中で、37^o C, 15 分間反応させた。反応溶液中には 0.3 μ M CaCl₂, 0.1% アスコルビン酸及び 10 μ M pargyline を添加した。反応終了後、CHCl₃/MeOH 混合液及び 0.25M HCl を加え、攪拌・遠心分離後、水層を分取し放射活性をシンチレーションカウンターにて測定した。

5) 各種蛋白質の免疫反応性

5 μ g (G 蛋白質及び tubulin) あるいは 20 μ g (I 型 AC 及び PLC β_1) の膜標本を 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、ニトロセルロース膜に転写し、5000 倍に希釈した抗体 (I 型 AC のみ 1000 倍) を用いて免疫染色した。I 型 AC, PLC β_1 , G α , G β 及び tubulin に対する抗体は、それぞれ AC1 及び PLC β_1 (Santa Cruz)、RM/1 及び AS/7 (NEN DUPONT)、tubulin polyclonal antibody (ICN) を用いた。検出システムには ECL (Enhanced Chemiluminescence, Amersham) 法を用いた。測定値の標準化にはヒト前頭葉皮質膜標本を標品として用いた。またリン酸化及び総 CREB 抗体によるウエスタンブロットでは脳ホモジナイズを用いて行った。

3. 結果

1) Ca²⁺非依存性 AC 活性変化

うつ病群では EGTA にてキレートした膜標本では基礎及びマンガン刺激 AC 活性が対照群と比べ有意低下を示したが、分裂病群においては変化が認められなかった。AD 群では各種 AC 活性が対照群と比べ有意低下を示した。

2) Ca²⁺調節性 AC 活性変化

うつ病群及び分裂病双方において健常者群と比較し Ca²⁺/Calmodulin 刺激時の AC 活性には有意差は認められなかったが、基礎活性値からの増加量を算出すると、AC 活性の Ca²⁺に対する反応性は有意に亢進していた。一方 AD 群においては Ca²⁺/Calmodulin 刺激時の AC 活性も有意に低下していた。

3) 総・リン酸化 CREB 量の変化

うつ病群においては総・リン酸化 CREB 量双方が低下を示した。AD 群では総 CREB 量には変化なく、リン酸化 CREB 量のみ低下を示した。

4) 5HT 刺激性 PLC β 活性変化

基礎、GTP γ S (3 μ M) 単独、GTP γ S 共存下 5HT (10 μ M) 刺激時の PLC β 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 5HT に対する感受性がうつ病群で有意に増加していた。一方分裂病群では基礎、GTP γ S (3 μ M) 単独、GTP γ S 共存下 5HT (10 μ M) 刺激時の PLC β 活性は有意に亢進を示した。

5) PLC β_1 及び I 型 AC の蛋白質発現量の変化

前頭葉における主要な Ca²⁺感受性 AC である I 型 AC 及び PLC β_1 蛋白質量は、いずれもうつ病群・分裂病群双方で有意に増加していたが、G α , G β 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。一方 AD 群においては I 型 AC 量は低下を示していたが、他の検索蛋白質量は不変であった。

6) ヒト前頭葉皮質における抗うつ薬のセロトニン刺激性 PLC 活性への影響

数種類の抗うつ薬の 5HT 刺激性 PLC β 活性に対する作用を 5HT_{2A} 受容体が豊富に存在するヒト前頭葉皮質膜標本において In Vitro にて実験を行った。5HT_{2A} 受容体拮抗作用を有する抗うつ薬トラゾドン、アミトリプチン、ミアンセリン及びアモキサピンはいずれも用量依存的な拮抗作用を示した。さらに 5HT_{2A} 受容体拮抗作用を有さない抗うつ薬の作用を検討した。クロミプラミンは高濃度で PLC β 活性を抑制したが、イミプラミン、マプロチリン、デジプラミンは明らかな作用を示さず、SSRI であるサートラリン及びフルボキサミンは高濃度 5HT 刺激性 PLC β 活性を軽度増強させる傾向が認められた。今回検討した抗うつ薬の 5-HT 刺激性 PLC β 活性に対する IC₅₀ 値を算出した結果からヒト前頭葉における 5-HT 刺激性 PLC β 活性を指標とした効力比は、受容体に対する効力比とは若干異なっていた。IC₅₀ 値はトラゾドン > アミトリプチン > アモキサピン > ミアンセリンの順であった。

4. 考察

クレペリン以来躁鬱病（感情障害）と精神分裂病は2大内因性精神疾患として確立され、それぞれ独立した経過、症状、病態が関与していることが示唆されてきている。しかしながら精神分裂病の25%に抑うつ状態が認められる事、感情障害にしばしば精神病像が伴う事など、この両極の病像に移行系が存在する。特に慢性精神分裂病における抑うつ症状と陰性症状は区別しにくく、完全に同一というよりむしろ一部オーバーラップする事象と考えられている。さらに最近臨床に導入されつつある新規分裂病治療薬セロトニン（5HT）-ドーパミン(DA)拮抗薬が DA2 受容体よりむしろ 5HT2A 受容体に親和性が強く、情緒面の改善に優れていること、また同様な 5HT2A 受容体拮抗作用を持つ抗うつ薬ミアンセリン、トラゾドンも陰性症状に有効とする報告がある。感情障害においてはこれまで死後脳・血球成分を用いた研究により 5HT 受容体機能亢進仮説が提唱されている。以上の事柄は感情障害と精神分裂病（とくに陰性症状の関連した）病態に共通の生物学的基盤が存在する可能性を強く示唆する。従って本研究で単極性うつ病と精神分裂病群双方に共通して 5HT に関連した IPs シグナルカスケードが亢進していたことと、数種類の抗うつ薬が 5HT 刺激性 IPs の産生を *in vitro* にて阻害したことは上記の症候学的・薬理学的に示唆されているうつ症状と精神分裂病の陰性症状の共通性の生化学的背景を推察させる所見と考えられた。

一方、代表的記憶障害疾患であるアルツハイマー病(AD)の3割が大うつ病の診断基準を満たすこと、抑うつ症状が AD のリスクファクターであることが指摘されている。このような臨床的視点から情動（感情）障害と記憶障害はそれぞれ互いに平行した、かつ相互に関連した過程であるとする説もあり、両疾患の神経科学的共通性の存在を推察させる。よって本研究において認められた、うつ病群とAD群において cAMP 産生機能の低下とリン酸化 CREB の低下は両疾患の共通の病態変化を示唆するものと考えられる。さらに、最近の組織病理学的研究および MRI, PET などの画像研究から、機能性障害と考えられていた感情障害・精神分裂病にADと類似した器質・構造的変化を示す所見が数多く報告されている。うつ病群、分裂病群、並びにAD群における cAMP・IPs 産生系の変化はさらに情報伝達の下流領域へ影響を与えリン酸化・脱リン酸化→転写活性変化→脳内遺伝子・蛋白発現の増減→神経可塑的变化→神経回路網・細胞構築の改変へと関連していると考えられ、この3疾患プロセスに共通な物質的基盤の存在を推定させる所見と考えられる。

文献

- 1) Gsell W, Lange KW, Pfeuffer R, et al. How to run a brain bank, A report from the AustroGerman brain bank. J. Neural. Transm. [Suppl], 1993; 39: 31-70.
- 2) Hatta S, Marcus MM, Rasenick MM. Exchange of guanine nucleotide between GTP-binding proteins which regulate neuronal adenylate cyclase. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1986; 83: 5438-5443.
- 3) Jope RS, Song L, Young LT, et al. The phosphoinositide signal transduction system is impaired in bipolar affective disorder brain. J. Neurochem/, 1996;66:2402-2409.

研究協力者

山口高史、常松理枝子、鵜飼渉、山本恵、橋本恵理、斎藤利和

