

厚生科学研究研究費補助金
障害保健福祉総合研究事業

自殺予防を目指した新規向精神薬開発に関する研究

総括研究報告書
(平成13年度)

主任研究者 西川 徹

平成 14 年 3 月

総括研究報告書（平成13年度）

目 次

I. 総括研究報告

自殺予防を目指した新規向精神薬開発に関する研究

西川 徹 1

II. 分担研究報告

自殺行動の神経回路および分子病態の解明と治療法開発への応用に関する研究

西川 徹 13

研究協力者 海野麻未、谷口 豪

ストレス反応の年齢依存的変化の分子機構解明と自殺行動との関連の検討

車地暁生 19

研究協力者 伊藤 卓

D-セリンシグナル調節による精神分裂病の自殺行動に対する新規治療法開発に関する研究

山本直樹 22

研究協力者 櫻井新一郎、嶋津 奈

遺伝子調節因子をターゲットとした新規向精神薬の開発研究

神庭重信 26

患者由来培養細胞を用いた新規気分安定薬の開発に関する研究

加藤忠史 28

自殺企図、試行の頻度およびその特徴についての研究

川村則行 30

研究協力者 宮崎隆穂

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧	35
Ⅳ. 研究成果の刊行物・別刷	41
Ⅴ. 平成13年度分担研究者氏名一覧	251

I. 総括研究報告

厚生科学研究費補助金（障害保健福祉総合研究事業）
自殺予防を目指した新規向精神薬開発に関する研究
総括研究報告書

主任研究者 西川 徹 東京医科歯科大学大学院精神行動医科学分野 教授
国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第三部 部長

研究要旨：わが国の自殺による死亡者は、平成9年の24,391名から平成10年の31,734名への変化に象徴されるように、最近増加の一途をたどり大きな社会問題となっており、従来の社会心理学的予防策を進展させるだけでなく、早急に自殺を減少させるのに効果的な新規向精神薬を開発する必要がある。このため、本研究では、自殺行動に関与する分子群と、これらの予防・治療薬開発の標的分子としての意義を明らかにすることをめざしている。そこで、1)自殺は発達および加齢に比例して増加する、2)気分障害、精神分裂病をはじめとする精神疾患や強度のストレスに伴う治療困難なうつ状態等が自殺行動を誘発すると考えられる、3)うつ状態惹起薬、抗うつ薬、ストレス等の効果には年齢によって著明な差が見られ、各年代で自殺行動に対して質的に異なる生体防御機構が作動している可能性がある、等の点に着目し、自殺行動に関与する神経回路や分子カスケードにアプローチしている。すなわち、これらの候補として、心理的ストレスと等価と考えられている不安惹起薬負荷、うつ状態モデル、うつ状態誘導薬投与等において、発達または加齢とともに反応性が変化する脳部位や遺伝子群の探索を進めた。今年度は、*c-fos*遺伝子の発現を指標としたラットの実験から、不安惹起薬投与後における脳の活動性変化は、幼若期と成熟期とでは異なり、大脳新皮質は最も差異が目立つ部位のひとつであることや、b)マウス大脳新皮質から、不安惹起薬投与により、幼若期、若年成熟期または老年期にそれぞれ選択的な発現変化を示す遺伝子が存在することを発見した。また、出生直後にハンドリングを行ったストレスに耐性モデルラットでは、母親から分離したストレス脆弱性モデルラットと比較して、成熟期にストレスを負荷した時の海馬における神経新生が増加していることを見出した。さらに自殺率が最も高い精神疾患である双極性気分障害（躁うつ病）への関与が推測されるミトコンドリアの遺伝子・遺伝子産物およびカルシウム動態の変化の分子機構についても解析を行い、一卵性双生児の躁うつ病不一致例ペアにおいて、リンパ球では、罹患双生児でのみ、従来躁うつ病で報告されてきたカルシウム反応の異常が出現することを明らかにした。一方、精神分裂病でも自殺率は10%以上の高率にのぼり、既存の抗精神病薬に抵抗性症状の治療法開発が急がれている。このような症状に対して改善作用をもつ内在性物質D-セリンのシグナル調節方法を検討する目的で、D-セリンの取り込み機構を調べ、脳組織に從來知られていなかった性質を示すD-セリン取り込み活性があることを見出した。

分担研究者

車地暁生

東京医科歯科大学医学部附属病院 講師

山本直樹

国立精神・神経センター神経研究所 室長

神庭重信

山梨医科大学 教授

加藤忠史

理化学研究所脳科学総合研究センター

チームリーダー

川村則行

国立精神・神経センター精神保健研究所 室長

A. 研究目的

わが国の自殺による死亡者は、平成9年の24,391名から平成10年の31,734名への変化に象徴されるように、最近増加の一途をたどり大きな社会問題となっている。これらの大半は、気分障害をはじめとする精神疾患や強度のストレスに伴う治療困難なうつ状態が原因と見られ、従来の社会心理学的予防策を進展させるだけでなく、早急に生物学的な予防方法を開発導入する必要がある。すなわち、自殺の生物学的マーカー分子、および画期的な予防・治療薬開発の標的分子を見出さなければならない。

そこで本研究では、実験動物、培養組織・細胞系等において、抗うつ薬スクリーニングに用いられるうつ状態モデル、心理的ストレスとしての不安惹起薬負荷、うつ状態誘導薬投与等における特異的な遺伝子発現とその脳内における分布や細胞内局在を検索することにより、自殺行動に関与する神経回路や分子カスケードを明らかにする。特に、ヒト、実験動物の双方で、うつ状態惹起薬、抗うつ薬、ストレス等の効果には年齢によって著明な差が見られることから、各年代で自殺行動等に対して質的に異なる生体防御機構が作動している可能性を注目しており、発達や加齢によりストレスやうつ状態への応答が変化する分子の検索を行う。また、最も自殺率の高い双極性気分障害（躁うつ病）への関与が推測されるミトコンドリアの遺伝子・遺伝子産物およびカルシウム動態の変化の分子機構を解明し、易再発性・難治性で自殺の危険が高いうつ状態の病態における意義を解明する。精神分裂病でも抗精神病薬抵抗性症状により予測が難しい自殺が多いため、難治性症状改善作用をもつ内在性物質D-セリンのシグナル調節機構を明らかにし新規治療薬開発の手がかりを得る。これらの研究結果をもとに、自殺の生物学的マーカーや新規治療薬の標的となる候補分子を抽出する。さらに、自殺念慮のある各年代の患者から提供されたサンプルの解析によりその妥当性を検証する。

B. 研究方法

今回報告した動物実験は、主任および分担研究者が所属する各施設の倫理委員会の承認を得た上、ガイドラインを遵守して行った。個々の研究方法は、以下に示す通りである。

1. 自殺行動の神経回路および分子病態の解明と治療法開発への応用に関する研究

(1) 対象および薬物

動物実験には、生後8~56日令のWistar系雄性ラットを用いた。ラットは22.0±0.5℃、湿度55%、8時より20時を明期とする明暗条件下で飼育した。試薬は、すべて市販のものを用いた。本年度はストレッサーとして、不安惹起薬のFG-7142 (N-methyl-beta-carboline-3-carboxamide (GABAA

受容体ベンゾジアゼピン部位逆アゴニスト) : 10~40mg/kg) を用いた。FG-7142は、0.1%のTween 80に懸濁し皮下注射 (s.c.) により投与した。対照群の動物には注射溶媒を投与した。薬物の投与量は、常にfree baseで計算した。

(2) c-fos遺伝子の脳内発現の検討

不安惹起薬に応答する神経回路の手がかりを得る目的で、脳の活動性変化に伴って発現誘導されるc-fos遺伝子の分布パターンを観察した。このため、c-fos遺伝子産物 (c-Fos蛋白) に対する特異的抗体を使った免疫組織化学を行った。これらの実験では、ラットを薬物投与から3時間後に、pentobarbital (50mg/kg, i.p.) 麻酔下で4%パラホルムアルデヒドを含む0.1Mリン酸緩衝液 (PB : pH7.4) を用いて灌流固定した。取り出した脳は、クリオプロテクションを行った後-80℃で凍結保存した。次に、クリオスタットを用いて40μmの前額断連続切片を作製し、正常山羊血清で1時間処理後、抗c-Fos血清と4℃で48時間反応させた。続いて、0.05%TritonX-100を含む0.01%PBS (PBST) で脳スライスを洗浄し、アビチン・ビオチン・ペルオキシダーゼ法 (ABC法: Vectastain ABCキット) に従って反応を行った後、ニッケルイオン存在下で、0.3%H₂O₂を加えジアミノベンチジンで発色させた。

(3) RNA arbitrarily primed PCR (RAP-PCR) によるRNA finger printing

不安惹起薬に対し、発達に伴って応答が変化する遺伝子を検索するため、RNA arbitrarily primed PCR (RAP-PCR) 法によるRNA finger printingを行った。生後8日齢または50日齢の動物に薬物または生理食塩水を投与後1時間で断頭し、大脳新皮質よりtotal RNAを抽出した。random hexamer によって合成したcDNAをテンプレートとし、12merからなるプライマーを用いてarbitrarily primed PCRを行った。増幅産物を変性ポリアクリルアミドゲルにて分離し、Syber Green (特) で染色後、蛍光イメージアナライザー (FluorImager SI, Molecular DynamicsまたはFMBIO監、TAKARA) で解析してfingerprintを得た。Fingerprint上で目的とする変化を示すDNAのバンドをゲルから切り出し、塩基配列を決定した。

(4) 遺伝子発現の定量的解析

RAP-PCR法で検出された遺伝子の種々の薬物に対する反応性は、半定量的RT-PCR法、co-amplification RT-PCR法等により定量的に解析した。すなわち、5～7個体のRNAサンプルをプールして合成したcDNAの希釈系列を用いてRT-PCRを行い、exponentialな増幅条件下での相対的比較を行った。co-amplification RT-PCR法では、種々の薬物処置によってほとんど変動がないと考えられる28S ribosomal RNAを同一チューブ内で同時に増幅し、目的とする遺伝子転写産物の発現量を28S ribosomal RNAの発現量で補正した。すなわち、3'末端をリン酸化処理した特殊なオリゴマーを一定の比率で加えることによって28sの増幅のカイネティクスを調整し、できるだけ広い範囲のサイクル数で目的とする転写産物と同じ条件で定量性が得られるように工夫した。DNAの定量解析は染色したゲルをCCDカメラで撮影した後、densitographにて行った。

2. ストレス反応の年齢依存的変化の分子機構解明と自殺行動との関連の検討

実験には、生後8日齢、8週齢、および77週齢の雄性マウス(C57/BL系)を用いた。ストレッサーとして、不安惹起薬のFG-7142 (N-methyl-beta-carboline-3-carboxamide (GABAA受容体ベンゾジアゼピン部位逆アゴニスト) : 10~40mg/kg) を用いた。FG-7142は、0.1%のTween 80に懸濁し皮下注射(s.c.)により投与した。対照群の動物には注射溶媒を投与した。

FG 7142 (20 mg/kg) またはvehicleを投与した1時間後に大脳新皮質を取り出し、RNeasy Midi (Qiagen) を用いて total mRNA を抽出した。それぞれの実験群において、8-10匹の等量をプールし、生後8日齢のFG 7142 投与群と対照群、生後8週齢のFG7142投与群と対照群、ならびに生後77週齢のFG7142投与群と対照群の合計6群のtotal mRNA サンプルを作製した。これらのサンプルを用いて、8,374 クローンに対するDNA チップスクリーニング(IncyteGenomics, Inc (Genome Systems Inc.)) を行い、さらに、半定量的RT-PCRにより測定した。一部の実験では、DNAアレイで検出された候補遺

伝子のFG 7142 投与後の発現変化を、8日齢または8週齢のラットの大脳新皮質でも検討した。

3. D-セリンシグナル調節による精神分裂病の自殺行動に対する新規治療法開発に関する研究

動物実験には、8日齢および7週齢のWistar系雄性ラットをもちいた。

ラット大脳皮質のD-セリン取り込み活性を検討するため、成熟ラットから単離した大脳新皮質組織に対し10倍量の氷冷等張sucrose bufferを加えてホモジナイズした後、遠心によりシナプトソームP2分画を調製した。100 mM 5,7-dichlorokynurenic acid (DCK)を添加してNMDA受容体への結合を阻害する条件にて、10 mM [3H]D-セリン存在下で32℃で各時間incubationした後、取り込まれた放射活性を測定した。同時に0℃でincubationした値を差分して得られた値を温度に依存性の特異的D-セリン取り込み活性とした。

4. 遺伝子調節因子をターゲットとした新規向精神薬の開発研究

(1) 母子分離

8週齢のラットを交配させ、出生日に8頭(雄4頭、雌4頭)選択した。3日目から11日目までの明期開始の4時間後に母親から3時間分離した母子分離群、15分間のハンドリングのみ行ったハンドリング群、コントロール群の3群のラットを飼育した。出生21日後に離乳を行い、10~11週齢まで飼育した。

拘束ストレス

ストレスは2、4、6時間の拘束ストレスを与えた。拘束ストレスの24時間前にBrdU50mg/kgを4回に分けて腹腔内に投与した。拘束ストレス後に4% PFAを大動脈より灌流固定した。

(2) 免疫染色

3% H₂O₂を用い内因性ペルオキシダーゼをブロックした後、4N HClでdenatureを行う。ウマ血清で30分間のブロッキング後、抗BrdU抗体にて24時間のインキュベーションを行った。二次抗体を用いた後にABC法にて増幅しDAB-Nickelにて発色させた。

(3) 定量的解析

400倍の光学顕微鏡を用い、海馬歯状回内側から2細胞の間の層に存在するBrdU陽性細胞数を数え、歯状回の面積で除して、平方ミリあたりの陽性細胞

数を各群で比較した。

5. 患者由来培養細胞を用いた新規気分安定薬の開発に関する研究

対象は、双極性障害患者11名、健康被験者10名、および3組の一卵性双生児（双極性障害不一致ペア2組および健康ペア1組）である。末梢血よりリンパ球を株化した。蛍光Ca²⁺感受性色素Fura-2、Rhod-2を用い、蛍光分光光度計により細胞質またはミトコンドリア内Ca²⁺濃度を測定した。静止時の細胞内Ca²⁺濃度を測定後、10 μMのCCCP、1 μMのPAF、または10 μMのthapsigarginを投与した。

6. 自殺企図、試行の頻度およびその特徴についての研究

勤労者3500人に対し、MINIを改変して、自殺企図の既往や現症を調べ、自殺傾向の高い人を集めた。

自己記入式アンケートを以下の内容で構成した。

- (1) Karasekの職業性ストレス尺度 (JCQ)
- (2) Sheehanの不安尺度
- (3) Zungの抑うつ尺度 (SDS)
- (4) トラウマチェックリスト
- (5) IESR-J
- (6) 改変版MINI

MINIの改変は、ここ一ヶ月と言う限定をとり、過去（生涯）全般に焦点を広げ、6問目を省いた。

自己記入式アンケートの統計処理後、MINIの面接を、改変版MINIの高得点者から試行する。

7. 統計学的解析

データの統計学的解析においては、2群間の比較にStudent's t-testまたはMann-Whitneyを用いた。3群以上の比較は、一元分散分析またはKruskal-Wallis testにもとづく多重比較テストにより行った。

C. 研究結果

1. 自殺行動の神経回路および分子病態の解明と治療法開発への応用に関する研究

(1) 不安惹起薬投与後の応答が発達依存的変化を示す神経回路の検索

心理的ストレスと等価と考えられる不安惹起薬FG-7142投与後（20mg/kg, s.c.）の脳内c-Fos様免疫反応の分布は、生後8日齢と50日齢のラット

の間で著明な差が認められた。生後50日齢の成熟期では、梨状葉皮質、前部帯状回（II~VI層）、脳梁膨大後方皮質（II~VI層）、新皮質（isocortex: II~IV層が中心）、中隔、扁桃体、小脳顆粒細胞層等に免疫反応が認められた。生後8日齢の幼若期では、前部帯状回（II~VI層）、脳梁膨大後方皮質（II~VI層）、新皮質（isocortex: II~IV層）、扁桃体、小脳顆粒細胞層等のc-Fos陽性細胞がきわめて少なく、さらに新皮質においてはVI層にほぼ局限している特徴があった。これに対して、梨状葉皮質や中隔では成熟期と同様のc-Fos発現が観察された。

(2) 不安惹起薬に対する応答が発達依存的変化を示す遺伝子の検索

RAP-PCRを用いた検討では、c-Fos発現の検討から、FG7142投与後のc-Fos発現の分布が発達に伴って著明に変化することがわかった大脳新皮質において、生後8日と56日でこの不安惹起薬に対する応答に差が認められる遺伝子を探索した。その結果、FG7142投与後に、成熟期にのみ発現が増加する新規遺伝子転写産物1種と、幼若期にだけ発現上昇が見られる新規遺伝子転写産物1種を検出した。

2. ストレス反応の年齢依存的変化の分子機構解明と自殺行動との関連の検討

Platelet-derived growth factor B-polypeptide (PDGF-B)の遺伝子発現量は、マウスの大脳新皮質において、FG7142投与によって、8週齢では有意に減少していたが、幼若期と77週齢では変化がみられなかった。幼若期と8週齢の結果は、ラットの大脳新皮質においても、ほぼ同様であることを、半定量的なRT-PCR法によって確認した。

また、transthyretinは幼若期に増加したが、生後8週齢および77週齢では変化しなかった。さらに、cytochrome P450, 2j5, 1種のEST, epithelial membrane protein1等の転写産物は、検討した3時期の中で、生後77週齢時にのみ発現が増加した。

3. D-セリンシグナル調節による精神分裂病の自殺行動に対する新規治療法開発に関する研究

ラット大脳皮質シナプトソームP2分画におけるD-セリン(10 mM)の取り込みは、時間経過とともにlinearに上昇し、約4分後にplateau levelに達した。3分間のincubationにおける取り込み活性は、

16.8 +/- 3.2 pmol/mg proteinであった。D-セリン取り込み活性は、大脳皮質および小脳で高く、肝臓および腎臓ではほとんど認められなかった。このD-セリン取り込みの体内分布は遊離D-セリンと分布と類似していた。

大脳皮質における取り込みのkineticsの検討から、低親和型トランスポーターの関与を示唆する結果が得られた。ナトリウムイオン非存在下では、存在下に比べ取り込み活性は23%程度に低下した。また、この取り込み活性は、L-セリン、L-アラニン等でも阻害されるがGABAやグルタミン酸では阻害されなかった。グリシンはD-セリンの取り込み活性を阻害したが、グリシンの取り込みのpHによる変化がD-セリンの取り込みとは異なることや、グリシンの取り込み活性をD-セリンが全く阻害しないことから、グリシントランスポーターによってD-セリンが取り込まれている可能性は低い。

以上に述べたD-セリン取り込み活性の性質は、全体としてこれまでに報告されている中性アミノ酸トランスポーターのいずれとも異なっていた。

4. 遺伝子調節因子をターゲットとした新規向精神薬の開発研究

母子分離群、コントロール群では拘束ストレスによってBrdU陽性細胞数に変化を見せなかった。ハンドリング群では4時間、6時間の拘束ストレスによりBrdU陽性細胞数が増加した。

5. 患者由来培養細胞を用いた新規気分安定薬の開発に関する研究

双極性障害患者では、健常対照群に比して、thapsigargin刺激によるCa²⁺反応が高い傾向が見られた。一方、基礎値、PAF刺激、CCCP刺激には差はなかった。CCCP刺激による変動は、ミトコンドリア遺伝子5178多型と関連しており、双極性障害になりにくい遺伝子型である5178A型では、ミトコンドリアのCa²⁺保持能が高い可能性が考えられた。双極性障害不一致ペアでは、患者側でPAFおよびThapsigarginによる細胞質Ca²⁺反応が亢進していた。基礎値およびCCCP反応には差がなかった。

6. 自殺企図、試行の頻度およびその特徴についての研究

3254人から有効回答が得られ、改変版MINIの得

点が0点（自殺傾向なし）が2881人であった。373名は、過去に自殺傾向が存在した。303人は自殺について考えたことがあり、自殺を計画したり試行した者は35名であった。ANOVAおよびT検定によると、自殺について考えたことのあるものは、不安抑うつ傾向強く、トラウマを経験し、そのPTSD的症狀（侵入、回避、麻痺）も強かった。自殺を計画したり試行した者は、仕事量が少なく、抑うつ傾向高く、トラウマの侵入、回避、麻痺症狀が強く、運動量はやや多かった。

D. 考察

1. 自殺行動の神経回路および分子病態の解明と治療法開発への応用に関する研究

自殺に関する統計を見ると、自殺は児童期以降に出現し年齢とほぼ比例して上昇していることがわかる。この傾向は、基本的には調査する年によらず一定していることから、自殺行動の原因となる重度のうつ状態・不安状態を引き起こすストレスに対する生体側の感受性が、年齢とともに高くなると考えられる。つまり、ストレスに応答する神経回路および分子カスケードが発達や加齢にしたがって変化を遂げるため、ストレスの侵襲を受けた後の情報処理に違いが生じ、自殺行動に結びつく確率変動すると推測される。言い換えると、ストレスに対して反応性を変化させる脳部位や分子の存在が予想され、これらを明らかにすることによって、自殺行動の神経回路および分子機構を知る手がかりを得られる可能性がある。

初年度は、以上の仮説に基づいて研究を進め、c-Fos発現を指標とした実験から、予想通り、心理的ストレスと同等と考えられる不安惹起薬に対する応答性が、発達に伴って著明に変化する脳部位と、ほとんど変化しない脳部位があることを明らかにした。このような発達期による差は、神経回路や分子カスケードの違いに基づくものではなく、FG7142の脳組織への移行、分解等の薬物動態の変化に起因するとも考えられる。この疑問を検討するため、薬物投与後の時間経過を観察したところ、成熟期と幼若期におけるそれぞれのc-Fos発現パターンは、90分から180分まで明らかな変化を示さなかった。した

がって、生後8日齢と50日齢の間に見られた差異は、薬物動態の変化によるものではなく、ストレス—FG-7142の刺激に反応する情報処理システムに発達に伴う変化が生じているためと推定される。また、こうしたシステムは、c-Fos発現パターンが発達によって強く変化する脳部位に存在する可能性が高く、自殺行動に関与するストレス応答機構が、最も変化が著しい部位のひとつである大脳新皮質を含むことが示唆された。

さらに、大脳新皮質から、幼若期あるいは成熟期に選択的にFG7142に反応する遺伝子転写産物が見出され、ストレス—は発達時期によって異なる分子カスケードに作用するという仮説が支持された。この所見は、幼若期にはストレスに対する血中コルチコステロンの上昇反応が認められないという報告をはじめ、ストレス反応の年齢的变化とも矛盾せず、その分子機構を検討する手がかりになることが期待される。

2. ストレス反応の年齢依存的変化の分子機構解明と自殺行動との関連の検討

主任研究者らの実験で、ラットにFG 7142 を投与すると、前初期遺伝子のひとつであるc-Fos の免疫活性が、大脳新皮質において、成熟期では著明な増加がみとめられたが、幼若期ではこの免疫活性の増加がほとんど認められないことが明らかになっている（主任研究者の分担研究報告書を参照）。 c-Fos は他の前初期遺伝子であるc-JunなどとAP1とよばれる転写調節因子を形成し、いろいろな遺伝子のプロモーターに結合して、その遺伝子の転写活性を亢進させことから、これらの結果は、大脳新皮質では、生後発達にともなって、不安惹起物質投与による遺伝子発現調節が大きく変化することを示唆している。従って、生後発達に伴って形成される抗ストレス応答システムにおいては、大脳新皮質が重要な部位のひとつであると考えられる。今年度の研究において、大脳新皮質では、PDGFB遺伝子が、成熟期においてのみ、その発現量が減少している可能性が示唆された。このPDGFBは、脳内では神経細胞やグリアに対する栄養因子として作用していることが知られているが、精神機能との関連は検討されていない。また、他に発達依存的な不安惹起薬応

答性が見られた、transthyretin、cytochrome P450、2j5、1種のEST、epithelial membrane protein1等についても、これまで脳における解析が進んでいない。今後、これらの遺伝子とその産生蛋白等に関して、種々のストレスや薬物負荷後の変化の脳部位による特徴、時間経過等を、詳細に調べることによりストレス応答システム、不安状態、うつ状態等における役割を明らかにし、自殺行動の治療・予防薬開発の標的分子としての意義を検討してゆく必要がある。

3. D-セリンシグナル調節による精神分裂病の自殺行動に対する新規治療法開発に関する研究

D-セリンは興奮性アミノ酸受容体のひとつであるNMDA受容体の内在性アロステリックアゴニストであり、脳内分布が高次脳機能にかかわるNMDA受容体NR2Bアイソフォームと一致する。また、NMDA受容体のチャンネル阻害作用を持つPCP (phencyclidine)が、ヒトにおいて精神分裂病様の陽性症状ならびに陰性症状を引き起こし、動物においても行動異常を引き起こすことが知られている。PCPによるこれらの異常は、抗精神病薬によって部分的にしか改善しないことから、PCP精神病やPCP投与動物は、陰性症状を中心とした難治性の精神分裂病症状の病態や治療法を研究するのに適切なモデルと考えられている。

D-セリンは、PCPで誘発される動物の行動異常に対して改善効果をもたらし、難治性精神分裂病に対して陽性および陰性症状、ならびに認知機能等の改善がえられたと報告されている。一方で、精神分裂病に限らず、自殺行動と前頭葉皮質のNMDA受容体機能低下の関係が示唆されている。これらの知見に基づいて、自殺予防のための新規治療薬の標的候補としての、D-セリン脳内代謝機構をあきらかにすることが本研究の課題である。

今回の研究結果から、D-セリンがラット大脳皮質シナプトソーム分画において飽和性、温度依存性に細胞内に取り込まれることがあきらかとなった。Na⁺依存性やアミノ酸選択性は、既知の中性アミノ酸トランスポーターと類似しているところもあるが、全体として一致しておらず、内在性D-セリンの取り込みには新規トランスポーターが関与している可

能性がある。このようなトランスポーターの阻害剤は、内在性D-セリンのシグナルを高めることにより、難治性精神分裂病症状を改善することが期待される。新規抗精神病薬を開発する上で、内在性D-セリン取り込みを選択的に調節するトランスポーター分子の同定がこれからの課題となると考えられる。

4. 遺伝子調節因子をターゲットとした新規向精神病薬の開発研究

すでに、ECT、TCA、SSRIにより神経新生が増加することが知られていることから、ストレス下での神経新生の増加がストレス耐性を生み出すメカニズムの可能性はある。

5. 患者由来培養細胞を用いた新規気分安定薬の開発に関する研究

双極性障害患者ではThapsigargin 刺激性Ca²⁺反応が高い傾向が見られたこと、2組の双極性障害不一致ペアでもほぼ同様の傾向を示したことから、Thapsigarginに対するCa²⁺反応の増加が双極性障害の病態と関連する可能性が考えられた。双極性障害における、Thapsigarginに対するリンパ球Ca²⁺反応の亢進は、Houghら(1999)も報告している。

一方、CCCPに対する反応がミトコンドリア遺伝子多型と関連していた。CCCPによるカルシウム上昇は、ミトコンドリアからのカルシウムの漏出を反映していると考えられるが、双極性障害のリスクを高めることを我々が以前報告した5178C型ではCCCP刺激性Ca²⁺反応が低いことから、ミトコンドリアのCa²⁺保持力が低いことが双極性障害のリスクと関係している可能性が考えられた。

6. 自殺企図、試行の頻度およびその特徴についての研究

Comprehensive Textbook of Suicidology」 Ronald W. Maris, Alan L. Berman, Morton M. Silverman著, THE GILFORD PRESS, 2000 によれば、自殺の原因は、衝動性など人間の生物学的基盤（遺伝も含む）と、フロイトのタナトスなどが上げられている。実際、自殺の急性期には、15分ごとの監視等の手厚い看護が必要と言われる。自殺はかなり発作的な衝動によって起こりうる。

しかし、自殺を企図するものには一定の傾向がある可能性がある。そのために、自殺のハイリスク群

というものを、末梢血によって予測することが可能かどうか確かめる。上記の結果から、彼らの末梢血中のmRNAの動きをDNAアレイによって調べ、何らかの傾向があるかどうか統計的に明らかにする上で、重要な情報を得た。末梢血からの自殺の予測という試みは全く無い点で独創的である。

E. 結論

1. 強い不安を惹起するストレスであるGABAA受容体逆アゴニスト、FG7412に対して、幼若期と成熟期で異なる応答を示す脳部位と遺伝子転写産物が初めて明らかになった。大脳新皮質は発達期の応答変化が著明であり、自殺行動が発現あるいは増加する神経機構を探索する上で研究対象として重要なことが示唆された。年齢依存的応答を示す遺伝子群は、その産物とともに、詳細な構造、局在、機能、発現調節機構、不安やうつ状態を引き起こす他のストレスに対する反応等を調べ、自殺行動の予防・治療薬開発の標的分子としての意義を明らかにする。

2. 今年度の研究によって、1)不安惹起薬により、大脳新皮質におけるPDGFB、transthyretin、cytochrome P450, 2j5, 1種のEST、epithelial membrane protein1等の発現が変化すること、および2)これらの発現変化は幼若期、早期成熟期、老年期によって異なることが初めて明らかになった。自殺率が年齢にしたがって上昇することや、ストレス反応性は年齢によって変化することを考え合わせると、このように不安惹起薬に対して年齢依存的応答を示す遺伝子は、自殺行動と関連するストレス応答システムの分子カスケードを構築している可能性がある。

3. 精神分裂病における自殺行動を予防するためのより効果的な治療法を開発する目的で、グルタミン酸伝達のシグナル修飾活性をもつ脳内在性D-セリンの作用および代謝の調節機構を検討した。シナプトソーム分画をもちいた動物実験の結果からD-セリンが大脳皮質においてナトリウム依存性に取り込まれることがわかった。この取り込み活性は、L-セリン、L-アラニン等でも阻害されるがGABAやグルタミン酸では阻害されず、脳に高く抹消組織ではき

わめて低い分布を示した。これらの所見から、内在性D-セリンが、新規トランスポーター分子を介して細胞内に取り込まれる可能性が示唆された。このようなトランスポーター分子は、精神分裂病の新規治療薬の開発に有用と考えられる。

4. ストレス耐性モデルでは、ストレス時に神経新生が促進される可能性がある。

5. 気分障害患者の末梢血より株化した培養リンパ芽球を用いて、細胞内カルシウム動態を調べた。双極性障害患者や一卵性双生児不一致例の罹患双生児では、ThapsigarginまたはPAF(platelet activating factor)の刺激に対するカルシウム反応が高く、双極性障害でCa²⁺動態が変化していることが示された。

6. 改変したMINIによって自殺傾向を職域で調べ、有効回答3254名中、過去に自殺傾向がなかったものが86.9%、自殺傾向はあるが低度群は10.2%、自殺を計画したり試行した者は1.1%であった。今後、さらに病歴調査、面接等を行う。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) 原著

1) Tsuchida H, Yamamoto N, Kajii Y, Umino A and Nishikawa T: Cloning of a D-serine-regulated transcript *dsr-1* from the rat cerebral cortex. *Biochem Biophysiol Res Com*, 280: 1189-1196, 2001

2) Murata M, Kashiwa A, Oshima A, Umino A, Kurachi M and Nishikawa T: Nomifensine-induced *c-fos* mRNA expression in the discrete brain areas of the developing rat. *Neurosci Lett*, 303: 99-102, 2001.

3) Yamamoto N, Tomita U, Umino A and Nishikawa T: Uptake of D-serine by synaptosomal P2 fraction isolated from rat brain. *Synapse*, 42: 84-86, 2001

4) Akeo Kurumaji et al., An association study

between polymorphism of L1CAM gene and schizophrenia in a Japanese sample. *Am J of Med Genet (Neuropsychiatry Genetics)*, 105: 99-104, 2001.

5) Takeo Yoshikawa, et al. Evidence for association of the myo-inositol monophosphatase 2 (IMPA2) gene with schizophrenia in Japanese samples. *Molecular Psychiatry*, 62: 202-210, 2001.

6) A. Kurumaji, et al. An association of the polymorphic repeat of tetranucleotide (TCAT) in the first intron of human tyrosine hydroxylase gene with schizophrenia in a Japanese sample. *Journal of Neural Transmission*, 108: 489 - 495, 2001.

7) Akeo Kurumaji et al. No association of two missense variations of the benzodiazepine receptor (peripheral) gene and mood disorders in a Japanese sample. *Am J of Med Genet (Neuropsychiatry Genetics)*, 105:172 -175, 2001.

8) H. Ishiguro et al. Association analysis of the pituitary adenylyl cyclase activating peptide gene (PACAP) on chromosome 18p11 with schizophrenia and bipolar disorders. *Journal of Neural Transmission*, 108: 849 -854, 2001.

9) T Domyo et al. An increase in [3H] SCH 23390 binding in the cerebral cortex of postmortem brains of chronic schizophrenics. *Journal of Neural Transmission*, 108: 1475-1484, 2001.

10) Suzuki, E., Yagi, G., Nakaki, T., Kanba, S., Asai, M.: Elevated plasmanitrate levels in depressive states. *Journal Affective Disorder* 63: 221-224, 2001.

11) Soma, M., Tamaoki, T., Kawano, H., Ito, S., Sakamoto, M., Okada, Y., Ozaki, Y., Kanba, S., Hamada, Y., Ishihara, T., and Maeda, S.: Mice lacking serum amyloid P component do not necessarily develop severe autoimmune disease. *Biochem. Biophys. Res. Com.*286, 200-205,

2001.

12) Kato T, Ishiwata M, Nagai T (in press) Mitochondrial calcium response in human transformed lymphoblastoid cells. Life Sciences

13) Tsuboi H, Miyazawa H, Wenner M, Iimori H, Kawamura N: Lesions in lateral hypothalamic areas increase splenocyte apoptosis. Neuroimmunomodulation 9(1): 1-5, 2001.

14) Drube J, Kawamura N, Nakamura A, Ando T, Komaki G, Inaba T: No leucine(7)-to-proline(7) polymorphism in the signal peptide of neuropeptide Y in Japanese population or Japanese with alcoholism: Psychiatric Genetics 11: 53-55, 2001.

15) Tetsuya Ando; Gen Komaki; Masami Karibe; Noriyuki Kawamura; Shinichiro Hara; Masato Takii; Tetsuo Naruo; Nobuo Kurokawa; Michiko Takei; Naoko Tatsuta; Mariko Ohba; Shinichi Nozoe; Chiharu Kubo; Toshio Ishikawa. 5-HT2A promoter polymorphism is not associated with anorexia nervosa in Japanese patients. Psychiatric Genetics 11:157-160, 2001.

16) Tetsuya Ando; Toshio Ishikawa; Noriyuki Kawamura; Masami Karibe; Mariko Oba; Naoko Tatsuta; Shinichiro Hara; Masato Takii; Tetsuo Naruo; Michiko Takei; Nobuo Kurokawa; Shinichi Nozoe; Chiharu Kubo; Gen Komaki. Analysis of tumor necrosis factor- gene promoter polymorphisms in anorexia nervosa. Psychiatric Genetics 11:161-164, 2001.

(2) 著書

1) Kajii Y, Toda S, Umino A and Nishikawa T: A molecular approach to identify essential factors for establishment of psychostimulant-induced behavioral sensitization. In K. Miyoshi, C.M. Shapiro, M. Gaviria, Y. Morita (Eds.) Contemporary Neuropsychiatry (Proceedings of the 3rd International Congress of Neuropsychiatry), pp. 341-346, Springer-Verlag, Tokyo, 2001.

2) 川村則行: PTSDの薬物治療. 心的トラウマの理

解とケア, じほう, 東京, 221-226, 2001.

3) 川村則行: 本当に強い人, 強そうで弱い人. 飛鳥新社, 東京, 2001.

(3) 総説

1) 車地暁生, 西川 徹: 精神分裂病の神経発達障害仮説から見た新薬開発の可能性. 臨床精神薬理学, 4: 189-196, 2001.

2) 山本直樹, 西川 徹: 新たな抗精神病薬開発の未来 特集「抗精神病薬50年のあゆみ」. Schizophrenia Frontier 2: 99-106, 2001

3) 西川 徹: D体のアミノ酸が脳ではたらく. 科学 71: 984-988, 2001

4) 西川 徹: 覚醒剤精神病の分子生物学. Current Insights in Neurological Science 9: 2-4 2001

5) 柏 淳, 西川 徹: メタアンフェタミン, コカイン 特集1「薬物依存の分子機構」. 脳21 4: 30-34 2001

7) 黒田安計, 西川 徹: 覚せい剤による遺伝子発現. 分子精神医学 2: 31-37 2002

8) 村岡新一郎, 梶井 靖, 平岡 秀一, 藤山 航, 海野麻未, 西川 徹: Methamphetamineに発達依存的応答を示す遺伝子の検索と逆耐性現象への関与. 精神薬療基金年報34: 34-38, 2002.

9) 山本直樹, 土田英人, 海野麻未, 梶井 靖, 岩間久行, 村岡新一郎, 桜井新一郎, 嶋津 奈, 西川 徹: 内在性D-セリンの代謝機構の解明と難治性分裂病症状の治療への応用. 精神薬療基金年報 34: 185-192, 2002.

10) 工藤耕太郎, 神庭重信, ストレスと神経細胞死, 医学のあゆみ, 197: 271-274, 2001.

11) 工藤耕太郎, 情動・ストレスと海馬, 臨床精神医学, 30: 1493-1498, 2001

12) 川村則行: サイコオンコロジーから学ぶ 2. ストレス・心理社会的要因と免疫機能. 第11回日本サイコネフロロジー研究会特別講演, ニホンメデイカルセンター, 臨床透析 17, 623-626, 2001.

2. 学会発表

(1) 特別講演, シンポジウム

1) Kajii Y, Muraoka S, Hiraoka S, Fujiyama K, Umino A, Nishikawa T: Possible involvement of

- neocortical expression of a novel rat gene for a synaptic PDZ molecule, Mrt1B, in stimulant-induced behavioral sensitization, Session S15 Stimulant-Induced Psychosis. The 9th International Catecholamine Symposium, Kyoto, 4.3, 2001.
- 2) Nishikawa T, Kajii Y, Hiraoka S, Umino A, Hashimoto T, Muraoka S, Kuroda Y: Psychotomimetics and the molecular basis of schizophrenia, Session S23 Catecholamine and Neuropsychiatric Disorders. The 9th International Catecholamine Symposium, Kyoto, 4.4, 2001.
- 3) 西川 徹, 梶井 靖, 村岡新一郎, 藤山 航, 海野麻未, 黒田安計: 精神分裂病への分子薬理学的アプローチ—病態解明と新しい治療法開発を目指して—。ライフサイエンス技術部会メディカル分科会講演会, 東京, 4.17, 2001
- 4) 西川 徹: 精神分裂病の分子病態 (2) . 第97回日本精神神経学会総会, 大阪, 5.18, 2001
- 5) 西川 徹: ゲノムサイエンスと精神医学: 分裂病で発現する遺伝子の研究. 第97回日本精神神経学会総会, 大阪, 5.19, 2001
- 6) Nishikawa T: Molecular Neurobiology of Schizophrenia. RIKEN BSI Summer Program, Wako, 7.6, 2001
- 7) 西川 徹: 覚せい剤による逆耐性現象と *mrt 1* 遺伝子. 「ここまで進んだ覚醒剤精神病の発症機序—よりよき治療を目指して」ニコチン・薬物依存研究フォーラム, 東京, 7.14, 2001
- 8) 西川 徹: 精神機能疾患の現在: 分子から画像まで 動物モデル. 新潟神経学夏期セミナー, 新潟, 7.27, 2001
- 9) Nishikawa T: Metabolism and functions of endogenous D-serine. Sanofi-Synthelabo Seminar, Bagneux, 8.7, 2001
- 10) 西川 徹: 「精神分裂病の分子病態を探る」—病因解明と新しい治療薬剤開発を目指して—. 和風会講演会, 大阪, 8.31, 2001
- 11) 西川 徹: 分裂病の分子メカニズムを探る. 東京精神神経科診療所協会例会, 東京, 9.8, 2001
- 12) 西川 徹, 梶井 靖, 村岡新一郎, 藤山 航, 海野麻未, 黒田安計: 中脳ドーパミンニューロンと精神機能「中脳ドーパミンニューロン: 21世紀における新展開」. 第24回日本神経科学学会・第44回日本神経化学会合同大会Neuro2001, 京都, 9.27, 2001
- 13) 西川 徹: 精神神経薬理についての最新情報—NMDA受容体と内在性D-セリンからみた分裂病の病態と治療法開発—. 2001年抗精神病薬研究会, 東京, 9.29, 2001
- 14) 西川 徹: 精神分裂病モデルにおける遺伝子発現と治療薬の開発. 第11回ヒューマンサイエンス総合研究セミナー, 東京, 10.30, 2001
- 15) 西川 徹: 分裂病症状の分子機構への発達神経科学的アプローチ. 東京都神経科学総合研究所セミナー, 11.20, 2001
- 16) Nishikawa T: Gene expression in animal models of schizophrenia, Annual Meeting of Korean Society of Biological Psychiatry, Seoul, 3.22, 2002
- 17) 2. 工藤耕太郎, 喬春香, 有田順, 神庭重信, 情動ストレスと海馬神経細胞の分子カスケード 第28回日本脳科学学会シンポジウム
- 18) 川村則行: ソーシャルサポートが免疫系 (Th1/Th2バランス) に与える影響. 第74回日本産業衛生学会, 研究会合同シンポジウムⅢ「職場ストレスと免疫毒性アレルギー予防の接点」高知, 2001.4.6.
- 19) 川村則行: 特別講演: サイコオンコロジーから学ぶ. 第11回日本サイコネフロロジー研究会
- 20) 川村則行 日本ストレス学会 シンポジウム PTSDと免疫機能 久留米
(2) 国際学会
- 1) Iwama H, Umino A, Hashimoto A, Takahashi K, Yamamoto N, Nishikawa T: Origin and regulation of extracellular D-serine in the rat brain: an in vivo microdialysis study. 7th International Congress on Amino Acid and Proteins, Vienna, 8.10, 2001
- 2) Yamamoto N, Tsuchida H, Umino A, Tomita U, Takahashi K, Hayashi F, Nishikawa T:

Uptake and release of D-serine in rat brain synaptosomes. 7th International Congress on Amino Acid and Proteins, Vienna, 8.10, 2001

3) Kawamura N, Kim Y, Asukai N, Ishikawa T, Komaki G: Suppression of Cellular Immunity Subjects with a History of PTSD American Psychiatric Association. 2001 Annual Meeting, New Orleans, 2001.5.5-10.

4) H Iimori, N Kawamura: The Effect of cigarette smoking on immunology

The 16th WORLD CONGRESS On PSYCHOSOMATIC MEDICINE In Goeteborg, Sweden, 25th August 2001 oral presentation

5) N Kawamura: Suppression of cellular immunity and ongoing sequels in male workers with a past history of posttraumatic stress disorder. The 16th WORLD CONGRESS On PSYCHOSOMATIC MEDICINE In Goeteborg, Sweden, 28th August 2001 oral presentation

6) Miyazaki, N. Kawamura, G. Komaki, T. Ishikawa: The Hypothetical Pathway from Optimistic Belief and Perceived Social Support to the NK cell Populations. The 16th WORLD CONGRESS On PSYCHOSOMATIC MEDICINE In Goeteborg, Sweden, 28th August 2001 poster presentation

(3) 一般学会

1) 織田健二, 大久保善朗, 石田竜二, 村田雄二, 太田克也, 松田哲也, 松島英介, 一宮哲哉, 須原哲也, 澁谷均, 西川 徹: 血管性うつ病患者の局所脳血流所見. 第23回日本生物学的精神医学会, 長崎, 4.11, 2001

2) 中村映里奈, 太田克也, 石井賢二, 伊澤良介, 西川 徹: PETを用いた全生活史健忘例における脳糖代謝の検討. 第23回日本生物学的精神医学会, 長崎, 4.11, 2001

3) 土田英人, 山本直樹, 梶井 靖, 海野麻未, 福井頭二, 西川 徹: D-セリンによって大脳皮質において誘導される遺伝子dser-1の解析. 第23回日本生物学的精神医学会, 長崎, 4.11, 2001

4) 梶井 靖, 戸田重誠, 西川 徹: 成熟ラット海馬におけるCDCrel-1 septinアイソフォーム (CDCrel-1F/CDCrel-1A) の発現. 第44回日本神経化学学会, 京都, 9.27, 2001

5) 山本直樹, 土田英人, 梶井 靖, 海野麻未, 西川 徹: ラット大脳皮質においてD-セリンによって誘導される遺伝子dser-1の解析. 第44回日本神経化学学会, 京都, 9.27, 2001

6) 工藤耕太郎, 喬春香, 神庭重信, 情動記憶と海馬, 第23回生物学的精神医学会

7) 工藤耕太郎, 喬春香, 神庭重信, 情動ストレスと海馬神経細胞可塑性の変化 第3回感情・行動・認知(ABC)研究会

8) 玉置寿男, 久保田正春, 杉山仁視, 前田秀一郎, 保坂恭子, 神庭重信 遺伝子改変マウスを用いたアルツハイマー病発症機構の解析 第3回感情・行動・認知(ABC)研究会

9) 加藤忠史, 石渡みずほ, 垣内千尋, 辻田高宏, 岡崎祐士, 久住一郎: 極性障害患者の培養リンパ芽球細胞内Ca²⁺反応—卵性双生児不一致例における検討. 第24回生物学的精神医学会

10) 朴商会, 川村則行, 小牧元, 富岡光直, 鄭晋郁, 宮崎隆穂: 韓国勤労者における日常の苛立ち事尺度開発. 第42回日本心身医学会総会, 鹿児島, 2001.5.24-25.

11) 飯森洋史, 原谷隆司, 石川俊男, 村上正人, 三木明子, 中田光紀, 川上憲人, 小牧元, 川村則行: 喫煙と免疫に関する研究. 第42回日本心身医学会総会, 鹿児島, 2001.5.24-25

12) 安藤哲也, 石川俊男, 原信一郎, 瀧井正人, 成尾鉄朗, 武井美智子, 黒川順夫, 苅部正巳, 龍田直子, 大場真理子, 川村則行, 野添新一, 久保千春, 小牧元: Anorexia Nervosa患者における腫瘍壊死因子アルファ (tumor necrosis factor α) 遺伝子プロモーター領域の多型解析. 第42回日本心身医学会総会, 鹿児島, 2001.5.24-25

13) 宮崎隆穂, 川村則行, 小牧元, 石川俊男, 山崎靖夫, 立道昌幸, 飯森洋史, 三木明子, Marcus Wenner, 福西勇夫: 知覚されたソーシャルサポートと免疫系の関連. 第42回日本心身医学会総会, 鹿児島, 2001.5.24-25

14) 飯森洋史, 白川修一郎, 原谷隆司, 石川俊男,
村上正人, 三木明子, 中田光紀, 川上憲人, 酒見正
太郎, 小牧元, 川村則行: 生涯診断PTSD患者の職
場適応に関する研究. 第42回日本心身医学会総会,
鹿児島, 2001.5.24-25

H. 知的所有権の取得状況

1. 研究方法

特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特記すべきことなし

II. 分担研究報告

厚生科学研究費補助金（障害保健福祉総合研究事業）
自殺予防を目指した新規向精神薬開発に関する研究
分担研究報告書

自殺行動の神経回路および分子病態の解明と治療法開発への応用に関する研究

主任研究者 西川 徹 東京医科歯科大学大学院精神行動医科学分野 教授
国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第三部 部長
研究協力者 海野麻未、谷口 豪

研究要旨：本研究は、年間3万人以上の犠牲者を数え、大きな社会的、医学的問題となっている自殺を減少させるため、自殺行動の分子機構および予防・治療薬開発の標的分子を明らかにすることをめざしている。このため、1)自殺は発達および加齢に従って直線的に増加する、2)気分障害、精神分裂病をはじめとする精神疾患や強度のストレスに伴う治療困難なうつ状態等が自殺行動を誘発すると考えられる、3)うつ状態惹起薬、抗うつ薬、ストレス等の効果には年齢によって著明な差が見られ、各年代で自殺行動に対して質的に異なる生体防御機構が作動している可能性がある、等の点に着目し、自殺行動に関与する神経回路や分子カスケードに発達神経科学的アプローチを試みている。初年度は、これらの候補として、心理的ストレスの一種と見なすことができる不安惹起薬のGABA_A受容体ベンゾジアゼピン部位逆アゴニストFG7142を負荷したラットにおいて、発達とともに反応性が変化する脳部位や、そこで発達段階依存的な異常応答性を示す遺伝子群の探索を進めた。脳の活動性変化の指標であるc-fos遺伝子発現に対するFG7142の影響は、幼若期と成熟期とでは著しく異なり、大脳新皮質は発達による差異が最も目立つ部位のひとつであることがわかった。さらに、differential cloning法を用い、FG7142を投与した8日齢および56日齢ラットの大脳新皮質において、いずれか一方の発達段階だけで発現が変化する新規遺伝子転写産物を、それぞれ一種類検出した。これらの所見は、発達に伴ってストレス応答の分子機構が変化することを示唆しており、自殺行動が年齢とともに増加することとも関連する可能性があると考えられた。

A. 研究目的

自殺は、最近の経済不況、社会状況の複雑化等の影響もあって、中高年を筆頭に各年代で急増する傾向にあり、犠牲者は年間3万人以上にも上る。大部分の自殺が、病苦、生活苦、家庭・勤務・男女・学校の問題等にもとづく強度のストレスや精神疾患によって引き起こされるうつ状態に起因しており、これまで諸要因に対する社会心理学的アプローチ、抗うつ薬・気分安定薬による治療等が行われてきたが効果は不十分であった。したがって、貴重な人材の損失と周囲への様々な負担を未然に防ぐため、自殺を著しく抑制することができる新しい視点からの治療・予防法の開発が急務となっている。

本研究では、1)自殺率が発達および加齢にほぼ比例して増加する、2)気分障害、精神分裂病をは

じめとする精神疾患や強度のストレスに伴う治療困難なうつ状態・不安状態等が自殺行動を誘発すると考えられる、3)うつ状態惹起薬、抗うつ薬、ストレス等の効果には年齢によって著明な差が見られ、各年代で自殺行動に対して質的に異なる生体防御機構が作動している可能性がある、等の点に着目し、発達神経科学的アプローチによって、自殺行動の分子機構および予防・治療薬開発の標的分子を明らかにすることをめざしている。初年度は、これらの候補として、心理的ストレスの一種と見なすことができる不安惹起薬負荷後に、発達または加齢とともに反応性が変化する脳部位や、そこで一定の発達または加齢の段階から異常応答性が出現するようになる遺伝子群を探索した。

B. 研究方法

今回報告した研究は、東京医科歯科大学および国立精神・神経センターの倫理委員会の承認を得た上、ガイドラインを遵守して行った。

1. 対象および薬物

動物実験には、生後8~56日令のWistar系雄性ラットを用いた。ラットは $22.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 、湿度55%、8時より20時を明期とする明暗条件下で飼育した。試薬は、すべて市販のものを用いた。本年度はストレッサーとして、不安惹起薬のFG-7142 (N-methyl-beta-carboline-3-carboxamide (GABAA受容体ベンゾジアゼピン部位逆アゴニスト) : $10 \sim 40\text{mg/kg}$) を用いた。FG-7142は、0.1%のTween 80に懸濁し皮下注射 (s.c.) により投与した。対照群の動物には注射溶媒を投与した。薬物の投与量は、常にfree baseで計算した。

2. c-fos遺伝子産物の脳内発現の免疫組織化学的検討

不安惹起薬に応答する神経回路の手がかりを得る目的で、脳の活動性変化に伴って発現誘導されるc-fos遺伝子の分布パターンを観察した。このため、c-fos遺伝子産物 (c-Fos蛋白) に対する特異的抗体を使った免疫組織化学を行った。これらの実験では、ラットを薬物投与から3時間後に、pentobarbital (50mg/kg , i.p.)麻酔下で4%パラホルムアルデヒドを含む0.1Mリン酸緩衝液 (PB : pH7.4) を用いて灌流固定した。取り出した脳は、クリオプロテクションを行った後 -80°C で凍結保存した。次に、クリオスタットを用いて $40\mu\text{m}$ の前額断連続切片を作製し、正常山羊血清で1時間処理後、抗c-Fos血清と 4°C で48時間反応させた。続いて、0.05%TritonX-100を含む0.01%PBS (PBST) で脳スライスを洗浄し、アビチン・ビオチン・ペルオキシダーゼ法 (ABC法: Vectastain ABCキット) に従って反応を行った後、ニッケルイオン存在下で、0.3% H_2O_2 を加えジアミノベンチジンで発色させた。

3. RNA arbitrarily primed PCR (RAP-PCR) によるRNA finger printing

不安惹起薬に対し、発達に伴って応答が変化する遺伝子を検索するため、RNA arbitrarily primed

PCR (RAP-PCR) 法によるRNA finger printingを行った。生後8日齢または50日齢の動物に薬物または生理食塩水を投与後1時間で断頭し、大脳新皮質よりtotal RNAを抽出した。random hexamer によって合成したcDNAをテンプレートとし、12merからなるプライマーを用いてarbitrarily primed PCRを行った。増幅産物を変性ポリアクリルアミドゲルにて分離し、Syber Green (特)で染色後、蛍光イメージアナライザー (FluorImager SI, Molecular DynamicsまたはFMBIO(監)、TAKARA) で解析してfingerprintを得た。Fingerprint上で目的とする変化を示すDNAのバンドをゲルから切り出し、塩基配列を決定した。

4. 遺伝子発現の定量的解析

RAP-PCR法で検出された遺伝子の種々の薬物に対する反応性は、半定量的RT-PCR法、co-amplification RT-PCR法等により定量的に解析した。すなわち、5~7個体のRNAサンプルをプールして合成したcDNAの希釈系列を用いてRT-PCRを行い、exponentialな増幅条件下での相対的比較を行った。co-amplification RT-PCR法では、種々の薬物処置によってほとんど変動がないと考えられる28S ribosomal RNAを同一チューブ内で同時に増幅し、目的とする遺伝子転写産物の発現量を28S ribosomal RNAの発現量で補正した。すなわち、3'末端をリン酸化処理した特殊なオリゴマーを一定の比率で加えることによって28sの増幅のカイネティクスを調整し、できるだけ広い範囲のサイクル数で目的とする転写産物と同じ条件で定量性が得られるように工夫した。DNAの定量解析は染色したゲルをCCDカメラで撮影した後、densitographにて行った。

C. 研究結果

1. 不安惹起薬投与後の応答が発達依存的変化を示す神経回路の検索

心理的ストレッサーと等価と考えられる不安惹起薬FG-7142投与後 (20mg/kg , s.c.) の脳内c-Fos様免疫反応の分布は、生後8日齢と50日齢のラットの間で著明な差が認められた。生後50日齢の成熟期では、梨状葉皮質、前部帯状回 (II~VI層)、脳梁

膨大後方皮質 (II~VI層)、新皮質 (isocortex: II~IV層が中心)、中隔、扁桃体、小脳顆粒細胞層等に免疫反応が認められた。生後8日齢の幼若期では、前部帯状回 (II~VI層)、脳梁膨大後方皮質 (II~VI層)、新皮質 (isocortex: II~IV層)、扁桃体、小脳顆粒細胞層等のc-Fos陽性細胞がきわめて少なく、さらに新皮質においてはVI層にほぼ局限している特徴があった。これに対して、梨状葉皮質や中隔では成熟期と同様のc-Fos発現が観察された。

2. 不安惹起薬に対する応答が発達依存的変化を示す遺伝子の検索

RAP-PCRを用いた検討では、c-Fos発現の検討から、FG7142投与後のc-Fos発現の分布が発達に伴って著明に変化することがわかった。大脳新皮質において、生後8日と56日でのこの不安惹起薬に対する応答に差が認められる遺伝子を探索した。その結果、FG7142投与後に、成熟期にのみ発現が増加する新規遺伝子転写産物1種と、幼若期にだけ発現上昇が見られる新規遺伝子転写産物1種を検出した。

D. 考察

自殺に関する統計を見ると、自殺は児童期以降に出現し年齢とほぼ比例して上昇していることがわかる。この傾向は、基本的には調査する年によらず一定していることから、自殺行動の原因となる重度のうつ状態・不安状態を引き起こすストレスに対する生体側の感受性が、年齢とともに高くなると考えられる。つまり、ストレスに反応する神経回路および分子カスケードが発達や加齢にしたがって変化を遂げるため、ストレスの侵襲をうけた後の情報処理に違いが生じ、自殺行動に結びつく確率が変動すると推測される。言い換えると、ストレスに対して反応性を変化させる脳部位や分子の存在が予想され、これらを明らかにすることによって、自殺行動の神経回路および分子機構を知る手がかりを得られる可能性がある。

初年度は、以上の仮説に基づいて研究を進め、c-Fos発現を指標とした実験から、予想通り、心理的ストレスと同等と考えられる不安惹起薬に対する応答性が、発達に伴って著明に変化する脳部位と、ほとんど変化しない脳部位があることを明らかにし

た。このような発達期による差は、神経回路や分子カスケードの違いに基づくものではなく、FG7142の脳組織への移行、分解等の薬物動態の変化に起因するとも考えられる。この疑問を検討するため、薬物投与後の時間経過を観察したところ、成熟期と幼若期におけるそれぞれのc-Fos発現パターンは、90から180分まで明らかな変化を示さなかった。したがって、生後8日齢と50日齢の間に見られた差異は、薬物動態の変化によるものではなく、ストレスに反応する情報処理システムが発達に伴う変化が生じているためと推定される。また、こうしたシステムは、c-Fos発現パターンが発達によって強く変化する脳部位に存在する可能性が高く、自殺行動に関与するストレス応答機構が、最も変化が著しい部位のひとつである大脳新皮質を含むことが示唆された。

さらに、大脳新皮質から、幼若期あるいは成熟期に選択的にFG7142に反応する遺伝子転写産物が見出され、ストレスは発達時期によって異なる分子カスケードに作用するという仮説が支持された。この所見は、幼若期にはストレスに対する血中コルチコステロンの上昇反応が認められないという報告をはじめ、ストレス反応の年齢的变化とも矛盾せず、その分子機構を検討する手がかりになることが期待される。今後、自殺行動関連候補分子として、詳細な構造、局在、機能、発現調節機構、不安やうつ状態を引き起こす他のストレスに対する反応等を明らかにするとともに、自殺行動の予防・治療薬開発への応用の可能性を検討する予定である。

E. 結論

強い不安を惹起するストレスであるGABAA受容体逆アゴニスト、FG7142に対して、幼若期と成熟期で異なる応答を示す脳部位と遺伝子転写産物が初めて明らかになった。大脳新皮質は発達期の応答変化が著明であり、自殺行動が発現あるいは増加する神経機構を探索する上で研究対象として重要なことが示唆された。年齢依存的応答を示す遺伝子群は、その産物とともに、詳細な構造、局在、機能、発現調節機構、不安やうつ状態を引き起こす他のストレスに対する反応等を調べ、自殺行動の予