厚生科学研究費補助金
脳科学研究事業

ストレスへの適応破綻の脳内分子機構の解明と予防法の開発に関する研究

平成13年度　総括・分担研究報告書

主任研究者　山　脇　成　人

平成14年(2002年)３月

目　次

Ⅰ．総括研究報告書

ストレスへの適応破綻の脳内分子機構の解明と予防法の開発に関する研究…… 1

山脇　成人

Ⅱ．分担研究報告書

1．ストレスによる遺伝子発現機構研究…… 11

森信　　繁

2．ストレスによる細胞内情報伝達機構研究…… 16

加賀谷有行

3．ストレスの適応破綻に関する臨床的研究-Sensory gating system-に関する研究…… 20

岡本　泰昌

4．ストレスの適応破綻の脳内分子機構の解明と予防法の開発に関する研究…… 22

西谷　信之

5．ストレス負荷時の神経細胞アクチン骨格再構成に関する研究…… 26

尾藤　晴彦

Ⅲ．研究成果の刊行に関する一覧表…… 29

Ⅳ．研究成果の刊行物・別刷…… 32

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）

総括研究報告書

ストレスの適応破綻の脳内分子機構の解明と予防法の開発に関する研究

主任研究者　山脇成人　広島大学医学部教授

研究要旨　ストレスに対する適応形成やその破綻の脳内メカニズムを明らかとする目的で、平成 13 年度は以下のような研究を試みた。1) 急性ストレス負荷によってカルシウム依存性の細胞内情報伝達物質である calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII)のリン酸化が亢進し、慢性ストレスに対する適応形成時にはリン酸化亢進はみられなくなることから、ストレス適応形成には細胞内カルシウムのホメオスターシスを維持するための情報伝達系の変化が密接に関与していると考えられた。2) 母子分離によって成熟期でのストレス脆弱性が形成され、脆弱ラット海馬ではストレス負荷によってストレス適応や細胞保護に密接に関与している C-Jun N-terminal kinase 2, 94 kDa-glucose regulated protein の発現が有意に低下していた。3) 薬理学的ストレスモデルであるリポ多糖(LPS)・インターロイキン 1β急性投与によって、セロトニン 2A 受容体を介した細胞内情報伝達機能が低下していた。4) GFP-actin 複合体を発現させた海馬神経細胞の初代培養細胞を用いて、シナプスを含む樹状突起スパイン内のアクチン細胞骨格の動態が、NMDA 受容体を介したカルシウム流入によってダイナミックに制御されることが明らかとなった。5) ストレスに対する適応機構を反映しうる sensory gating system に与える急性ストレスの影響の検討から、うつ病者のみらなず健常人でもストレス負荷時には認知機能の低下の引き起こされることや、ストレスを予測するという機能がストレスに関する感覚入力を抑制している可能性が示唆された。6) 急性ストレス性刺激に対して右海馬をはじめ前頭葉・頭頂葉でのθ波の増大が MEG によって検出され、海馬から大脳皮質へのニューラルネットワークの機能的連携が示唆された。7) 急性ストレス負荷時の MRS による検討から、海馬でのアセチルコリンの代謝やミトコンドリアのエネルギー代謝の増加を得ており、コリン作動性ニューロンのストレスによる影響が示唆された。8) 難易度の異なる刺激・課題に対する MEG を用いた大脳皮質の機能解明から、課題に応じて応答時間などが変化することが明らかとなり、大脳皮質は課題の難易度に対応した応答をすることでストレス性負荷を分散している可能性が得られた。

このような結果はストレス負荷に伴って海馬を主とした活動性の亢進が引き起こされ、その分子メカニズムには細胞内カルシウム濃度亢進を契機に引き起こされるカルシウム依存性キナーゼ・ファオスファターゼの機能亢進や、アクチン細胞骨格の動態の変化が関与していると考えられる。同時にストレスに対する適応の形成には、ストレス刺激に伴うCREBなどを介したカルシウムホメオスターシスの維持に関与する情報伝達系の遺伝子発現変化が重要であり、脆弱性形成にはJNK2, GRP-94といった分子の発現・機能障害が密接に関与していると考えられる。ストレス適応破綻の予防にはストレス予測による感覚入力の抑制や、ストレス難易度に応じた反応性の変化によるストレス負荷の分散が寄与している可能性が示唆されており、今後ストレス関連性精神障害症例でのこのような機能の検討が必要と思われる。

分担研究者

森信繁
　広島大学医学部・助教授
加賀谷有行
　広島大学医学部・講師
岡本泰昌
　広島大学医学部・助手
西谷信之
　国立身体障害者ﾘﾊﾋﾞﾘﾃｰｼｮﾝｾﾝﾀｰ研究所・室長
尾藤晴彦
　京都大学医学研究科・講師

A. 研究目的

適応困難なストレスに生体が暴露されると、種々の臓器で固有のホメオスターシスが障害され、適応破綻状態が引き起こされる。脳での適応破綻の表現型が精神機能の障害であり、精神医学的見地からみると外傷後ストレス障害や大うつ病がこれに該当すると考えられる。従ってストレスに対する適応破綻の脳内メカニズムを解明することは、ストレス関連性精神障害の発症機序・治癒過程の解明にもつながり、現在その有病率の増大が懸念されているうつ病の治療法の改革にも寄与する重要な課題と思われる。このような観点から本研究では基礎研究として、1) ストレスによる遺伝子発現障害のメカニズムの解明（分担：森信　繁）・2) ス

トレスによる細胞内情報伝達研究（分担：加賀谷有行）・3) ストレスによる神経機能形態研究（分担：尾藤晴彦）を、臨床研究として 4) 脳磁図（MEG）・機能的磁気共鳴画像法（fMRI）を用いたストレスによる脳機能変動の研究（分担：岡本泰昌）・5) 脳磁図（MEG）・磁気共鳴分光法（MRS）による脳機能研究とその画像診断（分担：西谷信之）を課題に、ストレスの適応破綻の分子メカニズムに関する研究を行った。

初年度になる平成12年度については、各分担研究部門で以下のような目的による研究を遂行した。

A-1. ストレスによる遺伝子発現障害のメカニズムの解明：脳内遺伝子の転写過程で重要な役割を担っている cAMP response element binding protein (CREB)の活性化－不活化に及ぼすストレスの作用を解明する目的で、本年度は calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) II のリン酸化（活性化）に及ぼす急性・慢性ストレスの影響を検討した。同時に本年度も、ストレス脆弱性の形成の脳内メカニズムを解明する試みとして、ストレス脆弱ラットの海馬でストレスによって特異的に発現の変動する遺伝子の探索を昨年度に引き続き行った。

A-2. ストレスによる細胞内情報伝達研究：ストレスによって引き起こされるセロトニン(5-HT2)受容体に共役した細胞内情報伝達系の障害を明らかにする目的から、本年度は薬理学的ストレスモデルとしてのリポ多糖(LPS)・インターロイキン 1β (IL-1β)投与による 5-HT 受容体刺激性行動の変化を検討した。

A-3. ストレスによる神経機能形態研究：ストレスによって引き起こされる海馬神経細胞の早期変性メカニズムを形態学的に解明することを目的に、昨年度作成に成功した可視化できる細胞骨格プローブ GFP-actin を用いて、細胞内カルシウム濃度の変化に伴う細胞骨格の移動を検討した。同時に本年度は、in vivo のストレスモデルでのダイナミックな形態変化を探索するため、GFP-アクチントランスジェニックマウスを作成した。

A-4. MEG を用いたストレスによる脳機能変動の研究：外界からの刺激に対して個体の適応を促進する形で作用していると考えられている sensory gating system（gating out と gating in という概念から成り立つ機能であり、前者は重要でない刺激に対する受容機能の縮小を、後者は重要な刺激に対する受容機能の増幅を意味する）のストレスによる変化を解明する目的で、本年度は健康成人およびうつ病患者を対象に MEG を用いて急性ストレスの gating out に及ぼす影響を検討した。同時にストレス事象の予測の感覚入力に与える影響を明らかとする目的で、快・不快などの情動刺激を用いた予期的反応時間課題に対する脳活動を、fMRI を用いて検討した。

A-5. MEG による脳機能研究とその画像診断：昨年度に引き続き本年度も、ヒト脳でのストレス負荷の及ぼす海馬を含む脳内処理メカニズム・伝達過程を、MEG・MRS を用いて非侵襲的に検討した。

B. 研究方法

B-1. ストレスによる遺伝子発現障害のメカニズムの解明

1) ストレスのおよぼす CaMKII 発現およびリン酸化への影響の解析

実験にはすべて、雄性 Sprague-Dawley ラットを用いた。急性ストレス負荷群では 15 分・45 分・90 分間の拘束ストレス負荷を、また急性ストレス負荷後 60 分群は 90 分間拘束ストレス後に 60 分間の解放時間を与えた。慢性(14 日)ストレス負荷群では、毎日 90 分間の拘束ストレスを与えた。対象とした脳部位は、大脳皮質前頭部・海馬である。CaMK II および phospho-CaMKII の発現は、Anti-CaM Kinase Ⅱ, alpha subunit (Upstate biotech.) または Anti-ACTIVE CaMKII pAb, (pT286) と Anti-ACTIVE Qualified Secondary Antibody Conjugates (Promega) を用いた Western blot 法で行った。

2) ストレス脆弱性形成に関与する遺伝子の検索

マクロアレイ法によるストレス脆弱性関連遺伝子の検索には、下記のストレス処置によるラット海馬を用いた。実験には、全て雄性 Sprague-Dawley ラットを用い、12 時間毎に明暗期を保ち飼育した。

ストレスパラダイム：誕生後 2～9 日目までの 8 日間、毎日午前中 1 時間母子分離を行ったものを母子分離群とした。誕生後通常の環境下で飼育したものを対照群とした。それぞれのラットが成長した後(約 300g)、拘束ストレス 2 時間を施行し、直後に断頭、海馬を摘出した。

マクロアレイ法：200 個の cDNA を含む Rat Stress Array を用いた。母子分離＋成熟期急性拘束ストレス群および対照群（成熟期急性拘束ストレス負荷のみ）、それぞれ 5 匹のラットの海馬から抽出した mRNA を混合して、[α-32P]dATP 存在下で逆転写反応を行いプローブとした。アレイにハイブリダイズ後、各 cDNA spot に結合しているプローブの放射活性を Fuji Film BAS2000 にて計測した。

Real-time quantitative PCR 法：マクロアレイ法にて発現に顕著な違いが認められた各遺伝子の coding sequence を Gene

Bank より検索し、これをデータに Primer Express ソフトウェアにて forward, reverse primer と Taq Man probe の塩基配列を設計し、各 primer や蛍光標識 Taq Man probe の合成を行った。このようにして作成したプライマーセットを使い、ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (SDS)を用いて PCR 反応を行い蛍光強度を計測後、SDS ソフトウェアで解析した。

Western blot 法：ラット海馬内 JNK2 蛋白発現量およびリン酸化の測定は Western blot 法にて行った。

自発運動量計測法：Eikou Science SCANET MV-10 を用いて、拘束ストレス終了後 30 分間の自発行動量の計測を行った。

B-2. ストレスによる細胞内情報伝達研究

ウィスター系雄性ラットにストレスを負荷する目的で LPS を腹腔内に単回処置した後に、セロトニン-2A 受容体作動薬である DOI 誘発性首振り運動（wet dog shakes : WDS）を観察した。また、インターロイキン-1β（IL-1β）単回処置後の DOI 誘発性 WDS についても検討した。

B-3. ストレスによる神経機能形態研究

1) GFP-actin 発現アデノウィルスを用いた過剰神経興奮状態における樹状突起アクチン動態の解析

マウス海馬錐体細胞の初代培養系において、GFP-actin 発現アデノウィルスを感染させ、種々の電気活動を負荷した時に、神経アクチン細胞骨格にどのような動態変化を及ぼすかをレーザー共焦点顕微鏡システムを用いタイムラプス計測した。電気刺激は以前尾藤らが開発したフィールド電極刺激法を用い、観測されたアクチンダイナミクスの時定数と高 K 刺激や NMDA 刺激時に認められた時定数を比較した。また、電気刺激にてどの細胞部位でアクチン動態変化が引き起こされるを同定した。

2) 神経細胞特異的 GFP-actin 発現マウスの作成

Columbia 大学医学部 Eric R. Kandel 教授より forebrain-selective な発現を可能にする CaMKII promotor の供与を受け、同プロモータ下流に GFP-actin を結合したコンストラクトを作成し、常法により C57BL/6 受精卵へ核内注入を行った。これを仮妊娠した親の子宮へ戻し、生まれた仔におけるトランスジーンの有無、またその子孫における germline transmission を Southern blot 法ならびに PCR 法によって確認した。

B-4. MEG を用いたストレスによる脳機能変動の研究

1) 健常者およびうつ病者を対象とした急性ストレスの Sensory gating system に及ぼす影響

健康対照者 6 名およびうつ病患者 8 名を対象に、寒冷刺激負荷前後に P50 suppression および Mismatch negativity (MMN: gating in に対応)を、ニューロマグ社製 204channel 脳磁計を用いて計測した。P50 suppression は 500 ms 間隔で呈示される一対のクリック音（1st, 2nd）を 8 秒間隔で提示し、クリック音に対する反応の強度の比（2nd / 1st : t/c ratio）で評価した（t/c ratio が小さいほど gating out の能力が高い）。MMN は 500 ms 間隔で連続して呈示される標準刺激の中に 20％の割合で逸脱刺激を提示し、逸脱刺激に対する加算波形から標準刺激に対する加算波形を引いた波形から MMN 反応を求めた。

2) 健常者を対象としたストレス予期の Sensory gating system に及ぼす影響

健常者 15 名を対象に、1.5T の MRI 装置(島津 Marconi 社製)を用い、予期的反応時間課題遂行時の fMRI を撮像した。課題は、二つ 1 組の刺激(予告刺激 S1 と標的刺激 S2)を一定の刺激間間隔(4sec)でモニターに呈示し、S2 後にボタン押し反応をさせた。S1 刺激として、○, △, □の幾何学図形を呈示した(100msec)。S2 刺激として、異なる情動価(快/不快/中性；各 30 枚)を持つスライドを呈示した(2sec)。被験者は、○-快、△-不快、□-中性のように S1-S2 の組み合わせを固定した条件(予期可能条件)と、S1-S2 の組み合わせがランダムな条件(予期不可能条件)を交互に行った。解析は SPM99 を用い、予期可能条件と予期不可能条件の時の脳活動領域を比較検討した。

B-5. MEG・MRS による脳機能研究とその画像診断

1) ストレス性刺激におけるヒト海馬ならびに大脳皮質活動の変化

a. 脳磁場による計測

１０名の健常成人（男性：４名、女性：６名、年齢：平均23.3歳、全員右利き）から、快・不快情報の弁別課題時の脳活動を、海馬並びに大脳皮質でも評価した。刺激はInternational Affective Picture System (IAPS, Lang et al., 1997)より、動物ならびに乳幼児の快・不快写真を選択した。動物同士もしくは乳幼児同士で、それぞれ快・不快写真を組にし、遮蔽室外に設置した液晶プロジェクタを介して、黒背景のスクリーン上に投影した。刺激呈示間隔を平均 2.0 秒・呈示時間0.3 秒で、各記録につき計100回ずつ、無秩序な順で被験者に呈示した。刺激制御は、遮蔽室外のパーソナルコンピューター上の画像制御プログラム Multi Stimuにて行った。快・不快写真の刺激呈示確率は、20また

は80％とし、いずれかを標的とした。組写真の呈示順は、被験者間で偏りのないように平均化した。

脳磁場記録は、122 及び 306 チャンネル全頭型 MEG (Neuromag 社製) を用いた。脳磁場波形は、刺激呈示開始時を起点として、刺激前 100 ミリ秒を基準として、刺激前 100 ミリ秒から刺激後 900 ミリ秒間で標的・非標的刺激毎に加算平均した。眼球運動と瞬目を監視するために、右眼裂外側部と下部に 2 個の Ag/AgCl 皿電極を接着した。通過周波数帯域を、脳磁場・眼球運動に対して 0.03-100 Hz、標本周波数を 403Hz とした。解析は、加算平均した波形の再現性を確認し、多電流源モデルを用いて、標的刺激に対する活動源の推定を行い、各被験者の頭部 MRI に重畳した。次に海馬ならびに大脳皮質の活動波形を、高速フーリエ変換にて周波数解析を行い、4Hz 帯域ごとに TSE を用いて事象関連同期・非同期現象 (event-related desynchronization: ERD 、event-realted synchronization: ERS) の解析を行った。

b. 事象関連磁気共鳴分光法による計測

ストレス刺激負荷に伴う、海馬における神経化学的変化を解明するために、初年度より開発してきた刺激呈示を起点とし記録を行う事象関連 MRS を、1.5 T、^{1}H-MRI (TR 1500, TE 135)において継続して行なった。被験者は、脳磁場計測に参加した 10 名の健常成人である。刺激は、脳磁場計測と同様のものを用いた。標的・非標的刺激の呈示確率は 20%、80% とした。標的刺激は、快・不快刺激のいずれかとし、被験者間で均衡するようにした。刺激呈示間隔、呈示時間は脳磁場計測と同様にし、パーソナルコンピューター上の STIM で制御し、液晶プロジェクターを介してスクリーン上に無秩序な順で投影した。被験者には Head Coil 上に設置した鏡を通して刺激を観察・識別し、標的刺激の出現回数を数えるよう指示した。

記録は、被験者頭部画像の撮像を、通常の T1-weighted image で最初に行った。これを基に、1x2x1 センチ立方の関心領域を左もしくは右の海馬体・海馬傍回に設定した。1 回の検査における刺激呈示回数は 150 回とした (記録時間 5 分)。撮像を開始は、刺激呈示開始時から 25 ミリ秒毎に遅延時間を設定し記録した。求められた MRS に対して、Choline-compound (Cho、分光周波数 3.20 ppm), Creatine-compound (Cr 、3.00 ppm), N-acetylaspartate (NAA、2.01 ppm)の分光周波数を含む周波数帯域で基線補正を行った上で高速フーリエ変換ならびに Gaussian 変換した後に、各スペクトルの積分値を算出した。その後に安静時の各物質の値で課題負荷時の値を補正し、Cho/NAA、Cr/NAA の相対値を統計処理した。

2) 難易度の異なる刺激・課題におけるヒト脳の活動の変化

右利き健常成人 9 名 (男 5 名、女 4 名、23-37 歳、教育年数は全被験者とも 16 年以上) を対象とした。刺激は、第一刺激(S1)、第二刺激(S2)を設定し、1 から 9 までの一桁の数、20、22、30、33, 40、44 を除いた 12-49 までの二桁の数字、ロシアまたはギリシャ文字の中から 9 文字 (Д、Ф、Ч、Л、Г、Э、Ж、Т、Ψ)、およびこの中の 2 種類から作成した 5 種類の図を用いた。各刺激は、縦 4.5×横 6.0cm の範囲内に黄色文字で投射した。刺激呈示時間は 400 ミリ秒で、刺激間隔は S1-S2 間を 1500 ミリ秒、S2-S1 間を 3500±350 ミリ秒、S2-S3 間を 2500 ミリ秒とした。対象課題は、数字、文字、図の観察とした。計算課題では、1 桁数字のみ、または 2 桁数字のみの暗算とした。S1 刺激の数字に S2 刺激の数字を加算し、第三刺激(S3) "＝" 呈示後に口頭で回答するよう被験者に指示した。記録・解析は、1) の脳磁図計測と同様に行った。応答磁場波形は、S2 刺激を起点にし、S2 刺激前 200 ミリ秒から刺激後 3000 ミリ秒までの誘発磁場波形を加算平均した。1 施行は 40 回の反応とした。

(倫理面への配慮)

本研究で行われたすべての動物実験及び臨床研究は、各研究者の所属機関の倫理委員会による審査を経て、研究の実施に関する許可を得たものである。

C. 研究結果

C-1. ストレスによる遺伝子発現障害のメカニズムの解明

1) 拘束ストレスのおよぼす CaMKII 発現・リン酸化への影響

急性ストレス (45 分間および 90 分間) 負荷では、対照群 (非ストレス負荷群) と比較して海馬内 p-CaMKII 発現に有意な亢進がみられた。大脳皮質前頭部の p-CaMKII 発現に関しては、急性ストレス 90 分間負荷群で有意な亢進がみられた。90 分間の急性拘束ストレス処置後に 60 分間の解放時間を与えた群では、海馬・大脳皮質前頭部ともに対照群に比し有意な変化を認めなかった。

慢性拘束ストレスに伴う体重の変化から、期間後半ではストレス負荷群も対照群と同程度の体重増加がみられ、慢性拘束ストレスに対する馴化が慢性ストレス終了時点では形成されていると考えられる。慢性ストレス負荷によって、海馬・大脳皮質前頭部での p-CaMKII 発現に、有意な変化はみられなかった。

p-CaMKII 発現で有意な亢進のみられた急性拘束ストレス群(45 分間・90 分間)

での CaMKII の発現を検討したが、海馬・大脳皮質前頭部ともに各群で対照群に比して CaMKII 発現に有意な差をみなかった。

2) マクロアレイ法を用いたストレス脆弱性関連遺伝子の探索

本年度はまず母子分離によって、成熟期ストレス負荷時のストレス反応性に変動をおよぼすかどうかを、行動解析および内分泌的に検討した。成熟期急性拘束後の自発行動量を母子分離群と正常発達群との間で検討したところ、母子分離群で有意に水平方向の自発行動量および探索行動量の低下をみた。急性拘束後の血清コルチコステロン値の計測から、正常発達群に比して母子分離群では有意に高い値を呈していた。

昨年度の検討結果から、母子分離＋成熟期急性拘束ストレス群の海馬で対照群（成熟期急性拘束ストレスのみ）と比較して著しく発現の低下している遺伝子として、C-Jun N-terminal kinase 2 (JNK2)及び 94-kDa glucose-regulated protein が抽出された。本年度はマクロアレイによるスクリーニングに続いて、発現の差を real-time PCR 法にて解析した。その結果、マクロアレイ法でのスクリーニング結果と同様に母子分離＋成熟期急性拘束ストレス群で、JNK2, GRP-94 mRNA の有意な発現低下がみられた。母子分離ストレスのみでは、成熟期ラット海馬の JNK2, GRP-94 mRNA 発現に有意な変化はみられなかった。次に蛋白発現量の解析のため、抗 JNK2 抗体を用いた Western blot 法にて発現を検討したところ、母子分離＋成熟期急性拘束ストレス群で対照群に比して有意な発現低下をみた。同様に抗 p-JNK2 抗体を用いた Western blot 法で JNK2 のリン酸化への母子分離＋成熟期急性拘束ストレスの影響を検討したところ、母子分離＋成熟期急性拘束ストレス群で対照群に比して有意な低下がみられた。

C-2. ストレスによる細胞内情報伝達研究

LPS を腹腔内に単回処置したラットでは、LPS の濃度に依存して DOI 誘発性 WDS が減少した。この効果は１～数時間持続した。LPS による DOI 誘発性 WDS の減少は、オピオイド受容体拮抗薬であるナルトレキソンやシクロオキシゲナーゼ阻害薬であるインドメタシンにより回復した。また、IL-1β単回処置後の DOI 誘発性 WDS についても減少した。

C-3. ストレスによる神経機能形態研究

1) GFP-actin 発現アデノウィルスを用いた過剰神経興奮状態における樹状突起アクチン動態の解析

Adex-CMV-GFP-actin を低タイターで初代培養海馬錐体細胞に感染させたときに、最も GFP-イメージングが容易に達成できることが分かった。そこで、同ウィルスにより GFP-actin を発現した海馬錐体細胞を用い、フィールド電極刺激により、神経活動依存的に制御される神経細胞骨格動態の可視化を行った。電気刺激は、毎１０秒毎に 50Hz 刺激１秒を繰り返した。この刺激を行うと、樹状突起スパインにおける GFP-actin の点状構造が一部増強されることが明らかになった。これは、過剰な NMDA 受容体刺激を介した Ca^{2+}流入によって、一部の樹状突起スパイン内アクチン集積が増強され、Ca^{2+}流入に伴なってみられる形態変化とよく合致していた。また、過剰な電位依存性 Ca^{2+} チャンネル刺激による Ca^{2+}流入に伴う細胞体辺縁部アクチン骨格は、少数の細胞であったが、電気刺激群でも再現された。

2) 神経細胞特異的 GFP-actin 発現マウスの作成

C57BL/6 由来受精卵へのマイクロインジェクションを約２００回行い、ICR 仮親子宮に戻した後、２２匹の仔が生まれた。各々について尻尾 DNA を採取・精製し、Southern Blot 法と PCR 法でトランスジーンの存在を調べたところ、２匹の仔にて、インテグレーションを確認できた。各々について、C57BL/6 に戻し交配し、germline transmission が確認された。現在、トランスジーンを両アレルに発現するマウスラインの作成と、同ラインにおける GFP-actin 発現プロファイルを確認中である。

C-4. MEG を用いたストレスによる脳機能変動の研究

1) 健常者およびうつ病者を対象とした急性ストレスの Sensory gating system に及ぼす影響の解析

寒冷刺激負荷前後でのクリック音に対する MEG を用いた聴覚刺激の情報処理過程の変化の検討から、健常者では t/c ratio および MMN 反応を増大させたが、うつ病患者では t/c ratio の増加のみで MMN 反応に対しては変化がみられなかった。

2) 健常者を対象としたストレス予期の Sensory gating system に及ぼす影響の解析

幾何学図形や情動価を持つスライドによる予告・標的刺激を用いた fMRI による予期反応課題に対する脳機能局在の検討から、予期可能条件では予期不可能条件と比較して、前頭前野の領域(内側前頭前野、背外側前頭前野)で有意な活動上昇を認めた。また、不快刺激を予期する時に後頭部の活動上昇が認められた。

上記の予期反応課題遂行中の MEG による記録から、快・不快いずれの情動刺激においても S2 刺激呈示前約 300msec 付近で、前頭前野に信号源がみられた。

信号源の強度は、快刺激と比較して不快刺激で大きかった。一方、情動刺激に対する後頭部視覚誘発反応は、快刺激と比較して不快刺激で小さかった。

C-5. MEGによる脳機能研究とその画像診断

1) ストレス性刺激におけるヒト海馬ならびに大脳皮質活動の変化の解析

快・不快写真の標的刺激を識別する課題では、不快刺激が 20%の確率で呈示され、かつ標的となっている時に、両側半球において応答磁場が明瞭に認められた。多電流源モデルによる活動源推定の結果、両側の後頭部、頭頂部、前頭部と海馬に活動源が認められた。活動源の大きさは、80%の不快刺激や快刺激よりも、20% 不快刺激を標的とした時、左右半球の海馬、頭頂部、前頭部のいずれにおいても最大であった。一方、TSE による解析では、20%不快標的刺激の呈示により、右海馬でθ波帯域が最も非同期していた。この変化は刺激呈示後 250-270 ミリ秒から認められ、400-450 ミリ秒で最大であった。また頭頂部、前頭部においてもこの傾向が認められた。これは、動物、乳幼児の写真にかかわらず認められた。

事象関連 MRS による研究では、cho/NAA と Cr/NAA は、不快標的刺激の方が、快標的刺激よりも大きく、特に右側海馬では左側に対して有意に大きかった。さらに刺激提示後から本スキャンまでの遅延時間を変化させた場合で、右海馬からの記録では、20%不快標的刺激に対して cho/NAA と Cr/NAA が、刺激提示後 265 ミリ秒後から急激に増大し、約 360 ミリ秒で減少していた。

2) 難易度の異なる刺激・課題におけるヒト脳の活動の変化の解析

図形の観察では、刺激後 100-550 ミリ秒の間に磁場応答が認められた。信号源は、100-250 ミリ秒で両側後頭部、後頭側頭移行部、下・中側頭部後方そして上頭頂部に、300-550 ミリ秒で下頭頂部に推定された。数字の観察では、図形の観察で推定された部位に加え、200-260 ミリ秒で左右、特に左側の上側頭部に推定された。数字の観察と一桁の計算では刺激後 250-700 ミリ秒で、磁場応答波形に差が認められた。信号源は、250 ミリ秒までは観察課題とほぼ同じ部位に推定された。250 ミリ秒後では、左半球では上側頭部後～下頭頂部（n=8、333 ミリ秒）、下前頭部（n=2、357 ミリ秒）、上側頭部中部（n=3、398 ミリ秒）の順に、また右半球では下前頭部（n=5、341 ミリ秒）、上側頭部（n=4、454 ミリ秒）、下頭頂部（n=3、495 ミリ秒）の順に活動していた。一桁と二桁の計算の比較では、両側半球前-中側頭部で応答波形に差が認められた。二桁の計算では、同部位での活動が 550-800 ミリ秒にみられ、一桁の計算に比べて活動時間が遷延する傾向が認められた。

D. 考察

ストレス適応破綻の脳内分子メカニズムの解明の一つとして、ストレスによって引き起こされる細胞内・核内情報伝達系の変動を、拘束ストレスと薬物的ストレスモデルである LPS, IL-1β投与から本年度は検討した。その結果、急性拘束ストレスでは細胞内のカルシウム濃度亢進やカルモジュリンの活性化によって機能が調節されている、CaMKII のリン酸化（活性）の亢進が明らかとなった。これまでの本研究者らの急性拘束ストレスによる PP2A, PP2B 活性や CREB のリン酸化の変化などの結果を含めて考察すると、急性ストレス負荷中には細胞内のカルシウム／カルモジュリン依存性のキナーゼ・フォスファターゼの活性が双方亢進するが、カルシウムキナーゼ系が有意であるため細胞内カルシウムは高濃度と予想され CREB 活性化を介した遺伝子発現が亢進することを示している。その一方で、急性拘束ストレス終了後には CREB 活性化の低下することからフォスファターゼ系が有意となると考えられ、ストレス終了後も軽度ではあるが細胞内カルシウムの濃度亢進が一過性に持続すると考えられる。同時に行った慢性拘束ストレス負荷に伴う CaMKII のリン酸化の検討から、急性ストレス負荷時とは異なり慢性ストレス負荷時では、ストレスに伴うリン酸化の亢進がみられなかった。慢性拘束負荷時のラットの体重変動から、ストレスに対して馴化の形成されていることが予想され、その結果有意なリン酸化の亢進がみられなったと考えられる。このような結果からストレス適応のメカニズムを考察すると、ストレスに伴う細胞内カルシウム濃度の亢進を抑制するような受容体・チャンネル部位での変化か、あるいはキナーゼ活性化を抑制するフォスファターゼの機能の亢進が密接に関与していると思われる。従って今後は、慢性ストレスのおよぼす NMDA 受容体を含む興奮性アミノ酸受容体の発現や、PP2A の発現・機能への効果を明らかにすべきと考えられる。

母子分離ストレスおよび成熟期急性拘束ストレスの研究から、母子分離を受けて成長したラットはストレスに伴う自発行動や内分泌機能の変化から、ストレスに対して脆弱なラットと考えられることが明かとなった。このようなストレス脆弱ラット群海馬で、成熟期ストレス負荷に伴う JNK2, GRP-94 発現の低下がみられたことは、下記のような機序によるストレス脆弱性の獲得が推論される。JNK2 のリン酸化の亢進は、急性拘束ストレス負荷・新しい環境への暴露・電気

けいれん処置によってみられることが報告されている。加えて慢性ストレス負荷や慢性電気けいれん処置後には、JNK2リン酸化発現の亢進は低下して、未処置群に比して有意な差はみられない状態となっている。このような所見から、JNK2は新しい環境などの刺激に対する適応形成に重要な働きをしている可能性が示唆されている。従って今回の結果でみられた成熟期急性拘束ストレスに伴う JNK2 発現や p-JNK2 発現の低下は、母子分離によって細胞外からの刺激に対する馴化機能の低下＝脆弱性の機序に密接に関与している可能性を示唆している。同時に母子分離＋成熟期急性拘束ストレス群で発現の低下がみられた GRP-94 遺伝子は、molecular chaperone 群に属する遺伝子であり、細胞ストレスに伴うカルシウム濃度の亢進や蛋白の障害に対して細胞保護的に機能することが報告されている。従って今回の結果でみられた成熟期急性拘束ストレスに伴う GRP-94 発現の低下は、母子分離によって細胞ストレスによる障害が起こりやすい個体を形成する可能性を示唆していると考えられる。

ストレスによる神経機能形態研究に関する本年度の検討から、全くあらたな神経細胞内樹状突起のアクチン細胞骨格可視化法を開発し、樹状突起スパインが過剰刺激により形態変化する一つのメカニズムを明らかにした。GFP-actin を用いることにより、初代培養細胞レベルでは、異なるカルシウム流入の過剰負荷が、樹状突起の形態変化を引き起こすことが証明された。これらの実験データは、神経活動、とくにストレス等にみられる過剰神経活動などにおいて、発生するカルシウム流入源の組み合わせによって、細胞骨格再構築の分布が制御されている可能性を示唆している。GFP-actin を神経細胞に発現するトランスジェニックマウスを用いることにより、このような発見がさらに *in vivo* のストレスモデル実験によっても実証できるよう今後実験を計画していく予定である。

昨年度から継続して行った急性ストレスの Sensory gating system に及ぼす影響の検討から、急性の物理的ストレスは健常者の gating out を減少させ、gating in を増加させた。急性のストレス状況下では外界のすべての情報に対して注意を払うことは理に適っており、これらの反応は急性ストレスに対する正常な適応反応であると考えられる。うつ病患者における物理的ストレスに対する反応の低下は健常者に認められたストレスに対する正常な適応反応が低下した状態、すなわちストレスに対する不適応状態を有する可能性が示唆された。また、情動的ストレス、特に negative な情動刺激は P50 suppression の t/c ratio を増加させ、物理的ストレスだけでなく、情動的ストレスも sensory gating system に対して影響を与えうることが明らかとなった。同時に行った、ストレス予期の Sensory gating system に及ぼす影響の検討から、将来の情動刺激予期における前頭前野の役割が示唆された。また、不快刺激が予期できる場合には、その感覚入力が抑制される可能性が示唆された。

ストレス性刺激に対する活動の変化に関する研究から、ストレス性刺激の認知課題において海馬が関与することを示していた。不快情報を標的にした際に、海馬において左右差を認めたが、これは不穏な顔表情の認知が扁桃を含む右辺縁系にて主として処理されるとするこれまでの研究と合致するものである。さらに MEG によりその海馬における活動の周波数解析から、θ 波帯域の活動が、不快標的刺激で右海馬において有意に増大することが明らかになった。この結果は海馬における興奮性シナプス後電位の上昇を示唆している。一方海馬における θ 波大域の増大はコリン作動性ニューロンで生じることが知られており、本研究の結果は不快情報の弁別課題における記憶のエンコーディングを反映していると考えられた。この海馬における θ 波帯域活動の上昇並びにピーク潜時は左海馬の方が右に比べて早期であった。このことは事象の記憶の更新が左海馬において先行していることを示唆するものである。

MRS の結果は不快刺激の弁別において、海馬のシナプスにおける神経伝達物質アセチルコリンの合成と分解、ミトコンドリアにおけるエネルギー代謝の、それぞれの亢進を示唆するものであり、MEG の結果を支持するものであると考えられる。さらに MRS を用いた本研究で刺激提示から計測までの時間を変更することにより、生体の神経化学物質の代謝の時間的変化を、非侵襲的に明らかに出来たことは、脳機能解明に新たな知見をもたらすと考えられる。

難易度の異なる刺激・課題におけるヒト脳の活動の変化の検討から、刺激の形態的な情報処理に続き計算処理が行われるが、一桁の計算における主たる活動部位は左上側頭部後部～下頭頂部であり、二桁の計算ではさらに活動部位が広汎な部位に及び、その応答も遷延していることが、明らかになった。このことは複雑な情報処理には、より多くの脳部位の資質を要することを示している。しかし一方でこの結果は、複雑な課題・ストレス性負荷を脳の局所部位で集中的に処理するのではなく、情報の持つ要因に準じて広汎な部位にストレス性素因を分散し、局所脳部位のストレス適応破綻を回避しようとする生体防御であるとも考えられる。そして、この情報分散メカニズムの

異常が、ストレス適応破綻疾患の発症に結びつくのではないかと考えられた。

E. 結論

昨年度に引き続き本年度もストレス適応形成・破綻の脳内メカニズムの解明を目的に、種々のストレスパラダイムを用いてストレス負荷に伴う脳機能の変化を、細胞内情報伝達機能・遺伝子発現機能・神経細胞の機能形態・脳磁場及びエネルギー代謝機能の各観点から検討した。1) 急性ストレス負荷初期にはキナーゼ系およびフォスファターゼ系の機能亢進が有意となり、ストレス終了後もフォスファターゼ系の機能亢進が持続することから、ストレス負荷中は顕著な細胞内カルシウム濃度の亢進が起こり負荷終了後も軽度の亢進が持続することが予想された。2) 慢性ストレス負荷によるストレスへの適応形成には、細胞内カルシウム濃度の調節に関連する受容体やチャンネルの発現や機能が慢性ストレスによって変化し、ストレスに対して細胞内カルシウムのホメオスターシスを維持するような機構の形成されることが関与していると推論される。3) 母子分離によって成熟期ラットでストレスに対する脆弱性が形成され、細胞外刺激への適応に重要な役割をもつ JNK-2 遺伝子や、細胞保護作用に密接に関与する HSP-90 遺伝子のストレス負荷時の有意な発現低下がみられた。4) ストレスに伴ってシナプス活動が過剰になると、シナプスを含む樹状突起スパイン内のアクチン細胞骨格の動態が NMDA 受容体を介したカルシウム流入によってダイナミックに制御され、このような変化がストレス性樹状突起病変に関与している可能性が示唆された。5) Sensory gating system に与える急性ストレスの影響の検討から、うつ病者のみらなず健常人でもストレス負荷時には認知機能の低下の引き起こされることや、ストレスを予測するという機能がストレスに関する感覚入力を抑制している可能性が示唆された。6) 急性ストレス負荷によって右海馬をはじめ前頭葉や側頭葉での MEG による θ 波の増大がみられ、海馬での興奮性シナプス後電位の亢進や、コリン作動性ニューロンの活性化が関与していると考えられる。7) 大脳皮質のストレス性負荷に対する機能解明研究の結果から、ヒト脳は課題の難易度に対応した応答をすることでストレス性負荷を分散し、ストレス適応破綻を回避していることが示唆された。

上記の研究結果をまとめると急性ストレス負荷に伴って海馬を主とした活動性の亢進が起こり、その分子メカニズムには細胞内カルシウム濃度亢進を契機に引き起こされるカルシウム依存性キナーゼ・ファオスファターゼの機能亢進や、アクチン細胞骨格の動態の変化が関与していると考えられる。ストレスに対する適応形成には、カルシウムホメオスターシスの維持に関与する情報伝達系の変化が重要であり、脆弱性形成には JNK2, GRP-94 といった分子の発現・機能障害が密接に関与していると予想される。今回の研究から得られた急性・慢性ストレスによる脳機能変化を、ストレス適応破綻モデルやストレス性精神障害症例で検討することが、ストレス適応破綻の脳内メカニズム解明につながると思われる。

F. 健康危険情報

該当事項なし。

G. 研究発表

G-1. 論文発表

1)Takahashi J, Tanaka K, Morinobu S, Fujimaki K, Li S-T, KatoK, Ohkawa M, Yamawaki S, Katon N. The influence of restraint stress on the expression and the serine/threonine phosphatase activity of calcineurin in the rat brain. Synapse 40: 130-136, 2001.

2)Fujimaki K, Morinobu S, Takahashi J, Yamawaki S, Kato N, Kanno M, Okuyama N, Kawakatsu S, Otani K, Kusumi I, Koyama T: Nucleotide sequence analysis of the binding site on the inositol 1, 4, 5-trisphosphate type-1 receptor in bipolar disorder. -A negative study- J Affect Dis 65: 139-143, 2001.

3)Hisaoka K, Nishida A, Koda T, Miyata M, Zensho H, Morinobu S, Ohta M, Yamawaki S. Antidepressant drug treatments induce glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) synthesis and release in rat C6 glioblastoma cells. J Neurochem 79: 25-34, 2001.

4)Fukumoto T, Morinobu S, Okamoto Y, Kagaya A, Yamawaki S. Chronic lithium treatment increases the expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the rat brain. Psychopharmacol 158: 100-106, 2001.

5)Kouhata S, Kagaya A, Nakae S, Nakata Y, Yamawaki S. Effect of acute lipopolysaccharide administration on (±)-1-(2,5-dimethoxy-4-iodophenyl)-2 aminopropane-induced wet dog shake behavior in rats: comparison with body weight change and locomotor activity. Prog. Neuro-Psychopharmacol. & Biol. Psychiat. 25: 395-407, 2001.

6)Katagiri H, Kagaya A, .Nakae S, Morinobu S, Yamawaki S. Modulation of serotonin-2A receptor function in rats after repeated treatment with dexamethasone and L-type calcium channel antagonist nimodipine. Prog. Neuro-Psychopharmacol. & Biol. Psychiat. 25: 1269-1281, 2001.

7)Miyoshi I, Kagaya A, Kohchi C, Morinobu S, Yamawaki S. Characterization of 5-HT2A

receptor desensitization and the effect of cycloheximide on it in C6 cells. J. Neural Transm. 108: 249-60, 2001.
8)Kurata K, Takebayashi M, Kagaya A, Morinobu S, Yamawaki S. Effect of β-estradiol on voltage-gated calcium channels in rat hippocampal neurons: a comparison with dehydroepiandrosterone. Eur. J. Pharmacol. 416: 203-212, 2001.
9)Sasaki Y, Hayakawa H, Kagaya A, Yamawaki S. Effect of forced running stress on behavior and on brain serotonin system in rats. Biogenic Amines 16: 137-155, 2001.
10)Yamamoto M, Hilgemann DH, Feng S, Bito H, Ishihara H, Shibasaki Y, Lin HL. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate induces actin stress fiber formation and inhibits membrane ruffling in CV1 cells. J. Cell Biol., 152: 867-876, 2001.
11)Yamasaki T, Kawaji K, Ono K, Bito H, Hirano T, Osumi N, Kengaku M. Pax6 regulates granule cell polarization during parallel fiber formation in the developing cerebellum. Development 128: 3133-3144, 2001.
12)Furuyashiki T, Bito H, Narumiya S. Regulation of cytoskeleton by Rho. in Signal transduction: Mechanisms that regulate cell fate and cell functions. (E. Nishida and S. Ohno eds., Kyoritsu Shuppan, Tokyo), pp.49-67, 2001.
13)Nishitani N, Maeno M, Maruyama K, Okamoto J. Magnetoencephalographic and biochemical aspects of event-related cognitive activities in hippocampus. NeuroImage 13 : S453, 2001.
14)Nishitani N. Role of hippocampus in auditory cognitive processing. Proceedings of the 12th International Conference on Biomagnetism 9-12, 2001.
15)Nishitani N, Hari, R. Temporal dynamics of cortical respresentation for action. Proceedings of the 12th International Conference on Biomagnetism 331-334, 2001.
16)Morinobu S, Fukumoto T, Tsuji S, Yamawaki S, Takahashi J, Tanaka K, Fujimaki K: Lithium and signal transduction. In Catecholamine Research: from molecular insights to clinical medicine. ed. by Nabeshima T. Kluwer Academic Plenum Publishers (in press) .
17)Nakae S, Kagaya A, Katagiri H, Yamawaki S. Serotonin-2A receptor and the receptor-mediated signaling systems in rats : possible implication for pathophysiology of mood disorders. Current Topics in Neurochemistry (in press)
18)山下英尚　他、脳磁図（MEG）を用いたストレス適応破綻の脳内機構に関する研究－Sensory gating system に焦点を当てた検討－薬療基金報告集(印刷中)
19)Nishitani, N.: Higher Brain Function and MEG. Brain Science and Mental Disorders. (in press).
20)Nishitani, N.: Brain Rhythm and Stress. Clinical Encephalography (in press).

G-2. 学会発表

シンポジウム

1)Morinobu S, Fukumoto T, Tsuji S, Yamawaki S, Takahashi J, Tanaka K, Fujimaki K: Lithium and signal transduction. 9th International Catecholamine Symposium. 2001. 4. 4-5. Kyoto, Japan.
2)森信　繁：情報伝達機能からみた難治性うつ病の発病機序．第 6 回日本神経精神医学会．2001. 6. 1-2. 宮崎.
3)Morinobu S, Fujimaki K, Takahashi J, Tanaka K, Kato N: Influence of stress on the phosphorylation of CREB and the activity of protein phosphatases in rat brain. 7th World Congress of Biological Psychiatry. 2001. 7. 1-6. Berlin, Germany.
4)Morinobu S: Molecular biology of the pathophysiology of PTSD. Collegium Internationale Neuro-Psychopharmacolgicum Regional Meeting. 2001. 10. 2-5, Hiroshima, Japan.
5)森信　繁：ストレス脆弱性形成の分子メカニズム．第 75 回日本薬理学会．2002. 3. 13-15. 熊本.
6)Kagaya A,.Yamawaki S. Modulation of intracellular calcium signaling by stress and mood stabilizers. 7th World Congress of Biological Psychiatry 2001. 7. 1-6. Berlin, Germany.
7)Matsuoka Y, Bito H, Kobayashi T, Sugimoto Y, Ushikubi F, Ichikawa A, Nakao K, Narumiya S. Sickness behavior and EP receptors. 第74回日本薬理学会年会．2001, 3.21-23, 横浜.
8)尾藤晴彦、古屋敷智之、ゼービオレーヌ、成宮周．シナプスから核へのシグナリング：CREB 制御のカルシウム依存性。第７８回日本生理学会年会．2001, 3.29-3.31, 京都.
9)松岡陽子、尾藤晴彦、小林拓也、杉本幸彦、牛首文隆、中尾一和、成宮周。ストレス反応におけるプロスタグランジンの役割。第７８回日本生理学会年会．2001, 3.29-3.31, 京都.
10)古屋敷智之、尾藤晴彦、成宮周。GFP を用いた神経細胞の局所における細胞骨格制御の解析。第７８回日本生理学会年会．2001, 3.29-3.31, 京都.
11)尾藤晴彦。神経活動依存性 Ca2+シグナリングによる CREB リン酸化調節とアクチン制御。第２４回日本神経科学学会、第４４回日本神経化学学会合同大会．2001, 9.26-9.28, 京都.
12)尾藤晴彦、松岡陽子、山田清文、ヘジュー、古屋敷智之、小林拓也、牛首　文

隆、鍋島俊隆、中尾一和、成宮周。PG 受容体欠損マウスにおけるストレス行動。第 75 回日本薬理学会年会 . 2002, 3. 13-3.15, 熊本.

一般発表

1)高橋　淳、田中和秀、藤巻康一郎、森信　繁、大川匡子：ラット脳内 protein phosphatase 2A 活性に及ぼすストレス・抗うつ薬の影響. 第 23 回日本生物学的精神医学会. 2000 年 4 月 11-13 日.　長崎.

2)末永貴美、辻　誠一、森信　繁、田中和秀、高橋　淳、藤巻康一郎、川野樹一朗、大川匡子、加賀谷有行、山脇成人、加藤進昌：ラット脳内 calcium/calmodulin dependent protein phosphatase に対するリチウムの影響. 第 22 回日本生物学的精神医学会. 2000 年 4 月 11-13 日.　長崎.

3)Tsuji S, Suenaga T, Kawano K, Sawada T, Kagaya A, Morinobu S, Yamawaki S: Searching for the genes in rat hippocampus regulating stress reactivity. 31th Annual Meeting of Japanese Society of Neuropsychopharmacology. 2001. 10. 2-5. Hiroshima, Japan.

4)田村達辞、森信繁、福本拓治ら　急性拘束ストレスによるラット脳 AP-1 結合能の変化に対するリチウム投与の影響 第 2 3 回日本生物学的精神医学会 2001.4.11-13 長崎.

5)松岡陽子、尾藤晴彦、山田清文、He Jue、小林拓也、牛首文隆、鍋島俊隆、中尾一和、成宮周。プロスタグランジン E 受容体 EP1 によるストレス行動の制御。第 2 4 回日本神経科学学会、第 4 4 回日本神経化学学会合同大会 2001. 9.26-9.28, 京都.

6)Takemoto-Kimura S, Ohmae S, Kikumura S, Tanji M, Furuyashiki T, Narumiya S, Bito H. Molecular cloning and characterization of CLICKs, novel candidates for CREB kinases of the Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase family expressed predominantly in the CNS. 第 31 回北米神経科学学会年会 2001.11.10-15.

7)Matsuoka Y, Bito H, Yamada H, He J, Kobayashi T, Ushikubi F, Muro S, Fukuda Y, Nabeshima T, Nakao K, Narumiya S. Neuroendocrinological, biochemical and behavioral impairments in EP1-receptor-deficient mice reveal a critical role for prostaglandin E2 in stress responses. 第 31 回北米神経科学学会年会 2001.11.10-15.

8)Ueda K, et al., Neural processing of emotional stimuli: A magnetoencephalographic study. 2001 Collegium Internationale Neuro-Psychopharmacologicum Regional Meeting, Hiroshima Japan, October 2-5, 2001.

9) Okada G, Okamoto Y, Ueda K , Yamashita H , Morinobu S, Yamawaki, S, Yokota N, Doya K. Activation of the prefrontal cortex in prediction of future reward -fMRI study - CREST Workshop on Metalearning and Neuromodulation (Kyoto) April 6. 2001

10)Okada G, Okamoto Y, Ueda K, Yamashita H, Morinobu S, and Yamawaki S. Effects of acute stress on prefrontal activation during verbal fluency task- fMRI study- 2001Collegium Internationale Neuro-Psychopharmacologicum(CINP) Regional Meeting Hiroshima. October 2-5. 2001

11)Okada G, Okamoto Y, Ueda K, Yamashita H, Kagaya A, Morinobu S, Yamawaki, S. Doya.Localization of brain activity in prediction of future reward using fMRI and MEG. Society for Neuroscience's 31st Annual Meeting, Novemberer 10–15, 2001.

12)岡田　剛，岡本泰昌，上田一貴，山下英尚，森信　繁，山脇成人，横田則夫，銅谷賢治.将来の報酬予測に関する脳機能画像研究－うつ病の新たな機能仮説をめざして一第 20 回躁うつ病の薬理・生化学的研究懇話会　2001.5.24-25.小樽.

13)Yamashita H et al, Impairment in P50 auditory sensory gating induced by acute stress. CREST workshop　2001.4. 奈良.

14)山下英尚　他、聴覚性 sensory gating system に対する急性ストレスの影響、広島脳機能研究会 2001.6. 広島.

15)山下英尚　他、脳磁図（MEG）を用いたストレス適応破綻の脳内機構に関する研究－Sensory gating system に焦点を当てた検討－薬療基金報告会 2001.12. 大阪.

16)Nishitani N, Maeno M, Maruyama K, Okamoto J: Magnetoencephalographic and biochemical aspects of event-related cognitive activities in hippocampus. 7th Annual Meeting of the Organization for Human Brain Mapping. (June, 2001in Brighton, UK).

17)Nishitani N: Higher Brain Function and MEG. In: Neurophysiological Approach to psychological functions. 11th Symposium by Research for Psychological and Neurological diseases. (Dec. , 2001 in Tokyo).

18)Nishitani N: Higher Brain Function and Neuroimaging . In: Panel Discussion: Research of Higher Brain Function by EEG and MEG – Recent Topics- . 31th Annual Meeting of Japanese Clinical Neurophysiology. (Nov., 2001 in Tokyo).

19)飯嶋　睦、西谷　信之：全頭型脳磁場計測装置による計算過程の解明.第 25 回日本脳神経 CI 学会総会　2001.2. 東京.

H. 知的財産の出願・登録状況

該当事項なし。

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）

分担研究報告書

ストレスによる遺伝子発現機構研究

分担研究者　森信　繁　広島大学医学部助教授

研究要旨　ストレス適応破綻のメカニズムには、ストレスによる脳内遺伝子発現の変動が深く関与していると予想され、その結果ストレス関連性精神障害が発症してくると考えられる。本分担研究者はこの仮説に従って本年度は、以下のようなストレスによる情報伝達系や遺伝子発現の変化を明らかとした。1) ストレス不適応状態ではCaMKIIのリン酸化が亢進し、適応の得られた状態ではCaMKIIのストレスによるリン酸化が抑制される。2) 母子分離によって形成されたストレス脆弱ラット海馬では、成熟期急性拘束ストレス負荷に伴うJNK-2, GRP-94遺伝子の発現が、正常発育ラット成熟期急性拘束ストレス負荷時に比して有意に低下している。

A. 研究目的

ストレスに関する臨床精神医学的研究から、適応困難なストレスに暴露されることによって、外傷後ストレス障害・大うつ病といった精神障害が引き起こされることが報告されている。このような精神障害は換言すればストレスによる脳内情報処理過程の適応破綻状態ともみなされ、ストレス適応破綻の脳内メカニズムを解明することは、上記精神障害の発症機序や治癒過程の解明に貢献すると予想される。

大うつ病や外傷後ストレス障害などの発症過程には慢性のストレス状態がしばしば前駆し、病状の回復には抗うつ薬を主とした慢性の薬物治療が必要となってきている。ストレス因の除去が困難で容易に再発を繰り返したような難治性の症例では、海馬の容積の減少が報告されている。同時に動物を用いたストレス研究から、適応困難なストレスに長期暴露された際には脳内で複数の遺伝子の発現が変動し、海馬の神経細胞の障害が引き起こされることも明らかとされている。上記のような臨床的・基礎的研究結果の蓄積は、脳内のストレス適応破綻のメカニズムに、慢性のストレスによる遺伝子発現の変化が密接に関連していることを示唆している。従って本分担研究者は、ストレス適応破綻の脳内メカニズムの解明には、ストレスによる遺伝子発現変動の機序を明らかにする必要があると考えた。

ストレスなどの外界からの刺激に伴う脳内の遺伝子発現変動には、細胞内から核内に情報を運び遺伝子の転写を調節する機能をもつ転写因子の活性が、key element であることが明らかとされている。中でも特に cAMP responsse element binding protein (CREB)は、プロテインキナーゼ A・カルシウム・神経栄養因子受容体など多くの細胞内情報伝達系の変化を受けて活性が調節されており、神経可塑性の一つの形である long-term potentiation の形成にも重要な因子と考えられている。これまで本研究者らは、CREB の不活化（リン酸化 CREB の脱リン酸化)に関与する、protein phosphatase2A, 2B の発現や機能に及ぼすストレス・抗うつ薬の影響を検討してきた。このため本年度は一層ストレスや抗うつ薬の CREB 活性化－不活化への影響を明らかとする目的で、 calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) II の活性に及ぼす、ストレス・抗うつ薬の影響を検討した。

ストレス適応破綻という現象を生体の側からとらえると、この現象はストレスに対する脆弱性という特性と関連があると推察される。従って同一ストレス条件下でストレスに脆弱な個体の脳に特異的に発現の異なる遺伝子を探索することは、ストレス適応破綻の分子メカニズムを解明する上で重要なストラテジーと考えられる。このような観点から本年度はストレス脆弱ラット海馬で特異的に発現の異なる遺伝子を、マクロアレイ・マイクロアレイ法を用いてスクリーニングする実験を行った。

B. 研究方法

B-1. CaMKII 活性の測定

実験にはすべて、雄性 Sprague-Dawley ラットを用いた。急性ストレス負荷群では 15 分・45 分・90 分間の拘束ストレス負荷を、また急性ストレス負荷後 60 分群は 90 分間拘束ストレス後に 60 分間の解放時間を与えた。慢性(14 日)ストレス負荷群では、毎日 90 分間の拘束ストレスを与えた。処置最終日の拘束ストレス終了直後（あるいは 60 分間解放後）に断頭し、全脳より大脳皮質前頭部・海馬を摘出し −80℃ で凍結保存した。

脳組織の蛋白量は、Bio-Rad Protein Assay 法で測定した。

CaMKⅡの Western blot は、Anti-CaM Kinase Ⅱ, alpha subunit (upstate biotechnology) を用い行った。phospho-CaMKⅡ(p-CaMKⅡ)の Western blot は、Anti-ACTIVE CaMKII pAb, (pT286) と Anti-ACTIVE Qualified Secondary Antibody Conjugates (Promega) を用いて行った。

B-2. マクロアレイ・マイクロアレイ法によるストレス脆弱性関連遺伝子の検索

実験には、全て雄性 Sprague-Dawley ラットを用い、12 時間毎に明暗期を保ち飼育した。

ストレスパラダイム：誕生後 2～9 日目までの 8 日間、毎日午前中 1 時間母子分離を行ったものを母子分離群とした。誕生後通常の環境下で飼育したものを対照群とした。それぞれのラットが成長した後(約 300g)、拘束ストレス 2 時間を施行し、直後に断頭、海馬を摘出した。同時に、採血も行った。

マクロアレイ法：200 個の cDNA を含む Rat Stress Array を用いた。母子分離＋成熟期急性拘束ストレス群および対照群（成熟期急性拘束ストレス負荷のみ)、それぞれ 5 匹のラットの海馬から抽出した mRNA を混合して、プローブ作成に用いた。抽出した mRNA を Dnase I 処理後に、[α-^{32}P]dATP 存在下で逆転写酵素を用いて single strand cDNA に逆転写した。これをプローブとしてアレイにハイブリダイズさせ、各 cDNA spot に結合しているプローブの放射活性を Fuji Film BAS2000 にて計測した。

マイクロアレイ法：用いたマイクロアレイは、1152 個の遺伝子に特異的な oligonucleotide を含む Margen 社の Rat Express Microarray である。マクロアレイを用いた実験と同様に、各群それぞれ 5 匹のラット海馬から抽出した mRNA を混合してプローブ作成に用いた。逆転写酵素を用いて single strand cDNA に逆転写後、double strand cDNA を作成し、これを鋳型に T7 polymerase 反応を用いて biotin-rCTP を取り込ませた cRNA を作成した。この cRNA probe を glass microarray と hybridization 後、biotin に対する二次抗体に cyanine-3 を結合させた複合体と incubation を行った。結果の解析には、GMS417 を用いた。

Real-time quantitative PCR 法：マクロアレイ・マイクロアレイ法にて発現に顕著な違いが認められた各遺伝子の coding sequence を Gene Bank より検索し、これをデータに Primer Express ソフトウェアにて forward, reverse primer と Taq Man probe の塩基配列を設計し、各 primer や蛍光標識 Taq Man probe の合成を行った。このようにして作成したプライマーセットを使い、ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (SDS)を用いて PCR 反応を行い蛍光強度を計測後、SDS ソフトウエアで解析した。

Western blot 法：ラット海馬内 JNK2 蛋白発現量およびリン酸化の測定は Western blot 法にて行った。サンプルはサイトゾール分画を取り出し、10% SDS ゲルで泳動し、ナイロン膜に転写した。次に、JNK2 あるいは phospho-JNK2 の 1 次抗体および 2 次抗体（HRP-linked）でインキュベーション後に、各物質に該当するバンドの濃淡をデンシトメーターで測定した。

自発運動量計測：Eikou Science SCANET MV-10 を用いて、拘束ストレス終了後 30 分間の自発行動量の計測を行った。

（倫理面への配慮）

本研究に用いたストレスパラダイムについては、広島大学動物実験倫理委員会の許可を得ている。

C. 研究結果

C-1. ストレスの及ぼす CaMKII リン酸化への影響

p-CaMKⅡの発現

急性ストレス（15 分間）負荷ラットでは、海馬・大脳皮質前頭部ともに p-CaMKII の発現に有意な変化はみられなかった。急性ストレス（45 分間および 90 分間）負荷では、対照群（非ストレス負荷群）と比較して海馬内 p-CaMKII 発現に有意な亢進がみられた。大脳皮質前頭部の p-CaMKII 発現に関しては、急性ストレス 90 分間負荷群で有意な亢進がみられ、急性ストレス 45 分間負荷群では発現亢進傾向がみられた。

90 分間の急性拘束ストレス処置後に 60 分間の解放時間を与えた群では、海馬・大脳皮質前頭部ともに対照群に比し有意な変化を認めなかった。

慢性拘束ストレスに伴う体重の変化を計測したところ、ストレス開始後 3-4 日目までは体重の増加は乏しくほぼ 5 日頃から増加がみられるようになり、拘束ストレス後半では対照群と同様に体重の増加のみられることが明らかとなった。この結果は、慢性拘束ストレスに対する馴化が形成されていると考えられる。慢性ストレス負荷によってストレスに対する馴化の形成されている群では、海馬・大脳皮質前頭部での p-CaMKII 発現に、対照群と比較して有意な変化はみられなかった。

CaMKⅡの発現

p-CaMKII 発現で有意な亢進のみられた急性拘束ストレス群(45 分間・90 分間)での CaMKII の発現を検討したが、海馬・大脳皮質前頭部ともに各群で対照群に比

して CaMKII 発現に有意な差をみなかった。

C-2. マクロアレイ・マイクロアレイ法によるストレス脆弱性関連遺伝子の検索

マクロアレイ法による検索結果：昨年度の検討結果から、母子分離＋成熟期急性拘束ストレス群の海馬で、対照群（成熟期急性拘束ストレスのみ）と比較して著しく発現の低下している遺伝子として、C-Jun N-terminal kinase 2 (JNK2)及び 94-kDa glucose-regulated protein が、母子分離＋成熟期急性拘束ストレス群の海馬で、対照群と比較して著しく発現の亢進している遺伝子として、vimentin, S30 ribosomal protein が抽出された。本年度は対照群と比較して顕著に発現の低下していた遺伝子群に焦点を当てて、発現の差を real-time PCR 法にて解析した。その結果、マクロアレイ法でのスクリーニング結果と同様に母子分離＋成熟期急性拘束ストレス群で、JNK2, GRP-94 mRNA の有意な発現低下がみられた。母子分離＋成熟期急性拘束ストレス群で有意な発現の低下をみた JNK2, GRP-94 遺伝子の発現が、母子分離ストレスのみによる影響か否かを明らかとする目的で、急性拘束ストレス負荷前の各遺伝子の発現を同様に real-time PCR 法で解析した。その結果、JNK2, GRP-94 mRNA 発現に、有意な差はみられなかった。次に mRNA 発現でみられた差が蛋白発現でもみられるかを検証する目的で、抗 JNK2 抗体を用いた Western blot 法にて発現を検討したところ、母子分離＋成熟期急性拘束ストレス群で対照群に比して有意な発現低下をみた。同様に抗 p-JNK2 抗体を用いた Western blot 法で JNK2 のリン酸化への母子分離＋成熟期急性拘束ストレスの影響を検討したところ、母子分離＋成熟期急性拘束ストレス群で対照群に比して有意な低下がみられた。

マイクロアレイ法による検索結果：昨年度の検討結果から、母子分離＋成熟期急性拘束ストレス群の海馬で対照群（成熟期急性拘束ストレスのみ）と比較して著しく発現の低下している遺伝子が 14 個、母子分離＋成熟期急性拘束ストレス群の海馬で対照群と比較して著しく発現の亢進している遺伝子が 3 個検出されている。このため本年度は、母子分離＋成熟期急性拘束ストレス群の海馬で対照群（成熟期急性拘束ストレスのみ）と比較して著しく発現の低下している遺伝子である、insulin-like growth factor binding protein2 (ILGFBP2)と regulator of G-protein signaling (RGS9)の発現を real-time PCR 法で検討した。その結果、ILGFBP2 および RGS9 の発現は 2 群間で有意な差がみられず、マイクロアレイの結果と異なっていた。

成熟期急性拘束後の自発行動量を母子分離群と正常発達群との間で検討したところ、母子分離群で有意に水平方向の自発行動量および探索行動量の低下をみた。急性拘束後の血清コルチコステロン値の計測から、正常発達群に比して母子分離群では有意に高い値を呈していた。

D. 考察

本研究によって急性拘束ストレスに伴い、CaMKII のリン酸化（活性）の亢進の引き起こされることが明らかとなった。本年度の研究結果に加え、これまで本研究者らが行ってきた protein phosphatase 2A, 2B 発現・活性や CREB のリン酸化への急性拘束ストレスの影響をみた研究結果をあわせて考察すると、以下のような脳内遺伝子発現への作用を急性拘束ストレスは有することになる。急性拘束ストレスによって CREB リン酸化は有意に亢進し、ストレス終了後には一過性の低下を経て再び basal レベルになっている。このような現象はストレス暴露直後は CREB リン酸化を促進する CaMKII の活性亢進が主要な役割を果たし、その後はリン酸化 CREB の脱リン酸化や CREB リン酸化の抑制に間接的に関与する、PP2B や PP2A の活性亢進が優位になることを示唆していると考えられる。急性ストレス負荷中に CaMKII および PP2B の活性が双方で亢進する結果は、ストレス負荷によって細胞内カルシウムの濃度亢進が引き起こされていることを間接的に示している。その一方でストレス負荷終了後に CREB リン酸化の一過性の低下をみたことは、ストレス負荷終了後も一過性に軽度の細胞内カルシウムの濃度亢進が持続するため、protein phosphatase 群のみが活性化された結果と考えられる。今回の検討では慢性拘束ストレス負荷で CaMKII 活性化の有意な変化がみられなかったが、この結果は急性拘束時と異なり CaMKII 活性化に必要な細胞内カルシウム濃度の亢進が起こらないか、あるいは活性化を抑制する PP2A の機能が亢進していることを示唆している。従って今後は、慢性ストレスのおよぼす NMDA 受容体を含む興奮性アミノ酸受容体の発現や、PP2A の発現・機能への効果を明らかにすべきと考えられる。同時に今回の慢性ストレスでみられたラットの体重変動から、ストレスへの馴化が形成された状態と考えられ、慢性ストレスに伴う CaMKII 活性亢進の欠如の機序を明らかにすることは適応獲得の機序解明に有効と思われる。

成熟期急性拘束ストレス負荷後の自発行動や内分泌変化から、母子分離ストレスを受けたラットは、ストレスに対して脆弱なラットと考えられる。このようなストレス脆弱ラット群海馬で、成熟期ストレス負荷に伴う JNK2, GRP-94 発現

の低下がみられたことは、下記のような機序によるストレス脆弱性の獲得が推論される。JNK2 のリン酸化の亢進は、急性拘束ストレス負荷・新しい環境への暴露・電気けいれん処置によってみられることが報告されている。加えて慢性ストレス負荷や電気けいれん処置後には、JNK2 リン酸化の亢進は低下して、未処置群に比して有意な差はみられない状態となっている。このような所見から、JNK2 は新しい環境などの刺激に対する適応獲得に重要な働きをしている可能性が示唆されている。従って今回の結果でみられた成熟期急性拘束ストレスに伴う JNK2 発現や JNK2 リン酸化の低下は、母子分離によって細胞外からの刺激に対する馴化機能の低下＝脆弱性の形成の機序に密接に関与している可能性を示唆している。同時に母子分離＋成熟期急性拘束ストレス群で発現の低下がみられた GRP-94 遺伝子は、molecular chaperone 群に属する遺伝子であり、細胞ストレスに伴うカルシウム濃度の亢進や蛋白の障害に対して細胞保護的に機能することが報告されている。従って今回の結果でみられた成熟期急性拘束ストレスに伴う GRP-94 発現の低下は、母子分離によって細胞ストレスによる障害が起こりやすい個体を形成する可能性を示唆していると考えられる。

E. 結論

本分担研究者らの初・2 年度の研究結果から、以下のことが明らかとなった。急性拘束ストレス負荷に伴って、細胞内カルシウム濃度によって活性が調節されている、CaMKII, PP2A, PP2B の活性の亢進の引き起こされることが明らかにされた。同時にストレス負荷終了後に CREB リン酸化の低下が一過性にみられることから、軽微ではあるがストレス終了後も一過性の細胞内カルシウム濃度の亢進の持続することが示唆された。慢性ストレス負荷では CaMKII 活性化はみられず、ストレス適応獲得の機序にストレス性細胞内カルシウム濃度亢進を抑制する何らかの情報伝達系の変化が寄与していると考えられ、今後は具体的なメカニズムの解明が期待される。

母子分離ストレスおよび成熟期急性拘束ストレスに伴う、海馬遺伝子発現の検討の結果から、ストレス脆弱群では JNK2, GRP-94 遺伝子発現の低下のみられることが明らかとなった。JNK2 は細胞外刺激に対する適応の獲得に、重要な役割を果たしているとされる遺伝子である。その一方で GRP-94 は細胞ストレスに対して、細胞保護作用を発揮する遺伝子である。従ってこのような遺伝子の発現低下は、個体のストレス脆弱性に密接に関与していると思われる。

F. 健康危険情報

該当事項なし。

G. 研究発表

G-1. 論文発表

1) Takahashi J, Tanaka K, Morinobu S, Fujimaki K, Li S-T, KatoK, Ohkawa M, Yamawaki S, Katon N. The influence of restraint stress on the expression and the serine/threonine phosphatase activity of calcineurin in the rat brain. Synapse 40: 130-136, 2001.

2) Fujimaki K, Morinobu S, Takahashi J, Yamawaki S, Kato N, Kanno M, Okuyama N, Kawakatsu S, Otani K, Kusumi I, Koyama T: Nucleotide sequence analysis of the binding site on the inositol 1, 4, 5-trisphosphate type-1 receptor in bipolar disorder. -A negative study- J Affect Dis 65: 139-143, 2001.

3) Hisaoka K, Nishida A, Koda T, Miyata M, Zensho H, Morinobu S, Ohta M, Yamawaki S. Antidepressant drug treatments induce glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) synthesis and release in rat C6 glioblastoma cells. J Neurochem 79: 25-34, 2001.

4) Fukumoto T, Morinobu S, Okamoto Y, Kagaya A, Yamawaki S. Chronic lithium treatment increases the expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the rat brain. Psychopharmacol 158: 100-106, 2001.

5) Morinobu S, Fukumoto T, Tsuji S, Yamawaki S, Takahashi J, Tanaka K, Fujimaki K: Lithium and signal transduction. In Catecholamine Research: from molecular insights to clinical medicine. ed. by Nabeshima T. Kluwer Academic Plenum Publishers (in press) .

6) Tanaka K, Takahashi J, Morinobu S, Fujimaki K, Tsuji S, Kato K, Ohkawa M, Yamawaki S, Kato N: Imipramine, but not lithium, induces the serine/threonine phosphatase activity of calcineurin without affecting its mRNA expression in the rat brain. Psychopharmacol (under revision).

G-2. 学会発表

シンポジウム

1) Morinobu S, Fukumoto T, Tsuji S, Yamawaki S, Takahashi J, Tanaka K, Fujimaki K: Lithium and signal transduction. 9th International Catecholamine Symposium. 2001. 4. 4-5. Kyoto, Japan.

2) 森信 繁：情報伝達機能からみた難治性うつ病の発病機序. 第 6 回日本神経精神医学会. 2001. 6. 1-2. 宮崎.

3) Morinobu S, Fujimaki K, Takahashi J,

Tanaka K, Kato N: Influence of stress on the phosphorylation of CREB and the activity of protein phosphatases in rat brain. 7th World Congress of Biological Psychiatry. 2001. 7. 1-6. Berlin, Germany.

4) Morinobu S: Molecular biology of the pathophysiology of PTSD. Collegium Internationale Neuro-Psychopharmacolgicum Regional Meeting. 2001. 10. 2-5, Hiroshima, Japan.

5) 森信　繁：ストレス脆弱性形成の分子メカニズム．第 75 回日本薬理学会．2002. 3. 13-15. 熊本.

一般発表

1) 高橋　淳、田中和秀、藤巻康一郎、森信　繁、大川匡子：ラット脳内 protein phosphatase 2A 活性に及ぼすストレス・抗うつ薬の影響．第 23 回日本生物学的精神医学会．2000 年 4 月 11-13 日．長崎.

2) 末永貴美、辻　誠一、森信　繁、田中和秀、高橋　淳、藤巻康一郎、川野樹一朗、大川匡子、加賀谷有行、山脇成人、加藤進昌：ラット脳内 calcium/calmodulin dependent protein phosphatase に対するリチウムの影響．第 22 回日本生物学的精神医学会．2000 年 4 月 11-13 日．長崎.

3) Tsuji S, Suenaga T, Kawano K, Sawada T, Kagaya A, Morinobu S, Yamawaki S: Searching for the genes in rat hippocampus regulating stress reactivity. 31th Annual Meeting of Japanese Society of Neuropsychopharmacology. 2001. 10. 2-5. Hiroshima, Japan.

H. 知的財産の出願・登録状況

該当事項なし。

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）
分担研究報告書

ストレスによる細胞内情報伝達機構研究

分担研究者　加賀谷有行　広島大学医学部神経精神医学講座　講師

研究要旨　うつ病や慢性ストレスによる精神機能変化や行動学的変化において脳内セロトニン-2A 受容体機能およびそれに連関する細胞内情報伝達機能の変化が重要な役割を示すと考えられている。本年度は、ラットのレベルでの LPS による急性ストレス負荷後のセロトニン-2A 受容体機能はどのように変化するか、ラットの種差によりセロトニン-2A 受容体機能に違いが見られるか、治療薬が脳内でどのような変化を惹起するかについて検討するために炭酸リチウムをラットに投与した後の脳内 AP-1 結合能および BDNF の産生量について検討した。さらに神経ステロイドの生理作用や作用機序について、ラット初代培養神経細胞を用いて細胞内カルシウム濃度に対する神経ステロイドの急性作用に関して、グリア由来培養細胞を用いて神経ステロイド合成酵素が脳内に存在するかどうか検討した。その結果、LPS や IL-1beta を腹腔内に単回処置したラットでは、DOI 誘発性 WDS が減少した。NER では、DOI 誘発性 WDS が、ウィスター系ラットに比較して有意に低値であったが、NER では DOI 投与により高率にけいれんが生じた。炭酸リチウムを慢性投与した後のラットでは、無処置ラットに比較して有意に AP-1 結合能が亢進していた。また、BDNF 量は炭酸リチウム投与ラットで最大約１５０％に増加していた。beta-エストラジオールやデヒドロエピアンドロステロンおよびデヒドロエピアンドロステロン硫酸エステルは GABA 刺激性、高濃度カリウム刺激性、NMDA 刺激性細胞内カルシウム濃度上昇を抑制した。グリア由来細胞が P450-SCC や 3-beta-HSD を発現させていることが明かとなった。

A. 研究目的

うつ病や慢性ストレスによる精神機能変化や行動学的変化において脳内セロトニン-2A 受容体機能およびそれに連関する細胞内情報伝達機能の変化が重要な役割を示すと考えられている。
例えばセロトニン-2A 受容体機能の亢進がうつ病に対して何らかの悪影響を及ぼしているとすると、生態内には元来その機能を抑制しようとする機構が働いていると想像される。
培養細胞のレベルでは、種々のストレスによりセロトニン-2A 受容体機能の低下することが知られている。例えばインターロイキンやリポ多糖（LPS）によるセロトニン誘発性細胞内カルシウム動員の抑制や、フッ化ナトリウム（NaF）、熱ストレスによるセロトニン刺激性細胞内カルシウム動員の抑制である。
培養細胞 C6 が LPS に曝されると、セロトニン-2A 受容体を介した細胞内カルシウム動員だけでなく、トロンビン刺激性細胞内カルシウム動員も抑制される。これは LPS 暴露により誘導性一酸化窒素合成酵素（inducible nitric oxide synthase; iNOS）の発現を介した細胞内カルシウム動員の抑制と考えられる。合成ステロイドであるデキサメサゾンは iNOS の誘導を阻害することにより、細胞内カルシウム動員の抑制を阻害し、結果的に亢進の方向に向かわせる。LPS による細胞内カルシウム動員の抑制が、細胞における適応機構によるものだとすると、デキサメサゾン処置による H-P-A 機能亢進が適応を破綻させて細胞内カルシウム動員を亢進させているという解釈が可能になる。
不思議なことに、脱感作に関しては、セロトニン-2A 受容体に特異的な反応であるが、LPS や熱ショックなどのストレスに関しては、セロトニン-2A 受容体に限らず、細胞内カルシウム動員系全般に対する修飾であると考えられている。
このようにセロトニン-2A 受容体は抑制性の調節をされやすい受容体なので、生体内でもその機能が抑制された状態で働いている可能性が十分考えられる。すなわち、これらの抑制性調節の障害された状態を感受性亢進と捕えている可能性があるわけである。細胞内におけるプロテインキナーゼ C、カルモジュリン依存性の経路あるいはチロシンキナーゼの機能不全や、ホルモンの作用としての H-P-A 機能の亢進によりセロトニン-2A 受容体が感受性亢進となる可能性が考えられる。
ではラットのレベルでのストレスによるセロトニン-2A 受容体の変化は観察されるのであろうか。本年度は、（１）ラットのレベルでの LPS による急性ストレス負荷後のセロトニン-2A 受容体機能はどのように変化するか、（２）ラットの種差によりセロトニン-2A 受容体機能に違いが見られるか、について検討した。
次に、ストレスなどを誘因とするうつ病などの治療薬が脳内でどのような変化を惹起するかについて検討するために（３）気分安定薬であり躁うつ病の病相予防や抗うつ効果を有すると考えられている炭酸リチウムをラットに投与した後の脳内 AP-1 結合能および脳由来神経栄養因子（BDNF）の産生量について検討した。
さらに、視床下部―下垂体―副腎皮質系の機能亢進によるステロイドホルモンの異常に関しても、うつ病の成因に関与している可能性が指摘されている。ステロイドホルモンは副腎、性腺などの末梢の臓器で産生されると考えられていたが、いくつかのステロイドホルモンはグリア細胞や神経細胞など中枢神経系でも合成されて脳内で直接作用することが知られるようになり、神経ステロイドと呼ばれている。不安や記憶の

への関与など一部報告はあるが、精神機能や精神疾患における神経ステロイドの生理作用や作用機序についてはまだまだ不明な部分が多く残されている。そこで、（4）ラット初代培養神経細胞を用いて、細胞内カルシウム濃度に対する神経ステロイドの急性作用に関して、（5）グリア由来培養細胞を用いて神経ステロイド合成酵素が脳内に存在するかどうか検討した。

B. 研究方法

（1） ウィスター系雄性ラットにストレス負荷する目的で LPS を腹腔内に単回処置した後に、セロトニン-2A 受容体作動薬である DOI 誘発性首振り運動（wet dog shakes : WDS）を観察した。また、インターロイキン-1beta（IL-1beta）単回処置後の DOI 誘発性 WDS についても検討した。

（2） 野田てんかんラット（NER）を使用して DOI を投与した後の WDS やけいれんを観察し、ウィスター系ラットと比較した。また[3H]-ケタンセリンを用いた受容体結合実験により脳内セロトニン-2A 受容体密度を測定した。

（3） ウィスター系雄性ラットに食餌に混在させた炭酸リチウムを２週間慢性投与した後のラット脳を取り出した。ゲルシフトアッセイ法により AP-1 結合能を測定した。また、ELISA 法により BDNF タンパク量を、ウェスタンブロット法により BDNF 受容体である TrkB のタンパク量を測定した。

（4） ラット胎児脳より取り出した神経細胞を数日培養した後にカルシウム感受性蛍光色素 fura-2 を神経細胞に負荷し、GABA 刺激性、高濃度カリウム刺激性、NMDA 刺激性細胞内カルシウム濃度変化を測定した。神経ステロイドである beta-エストラジオールやデヒドロエピアンドロステロンおよびデヒドロエピアンドロステロン硫酸エステルを処置した時の GABA 刺激性、高濃度カリウム刺激性、NMDA 刺激性細胞内カルシウム濃度上昇を測定し、無処置時の反応と比較した。

（5） グリア由来培養細胞 C6 を培養し、神経ステロイド合成酵素である P450-SCC や 3-beta-HSD の発現を PCR 法により mRNA レベルで検討した。また培養細胞 C６に抗うつ薬クロミプラミンを前処置した後にの P450-SCC や 3-beta-HSD の mRNA 発現についても PCR 法により測定した。

C. 研究結果

（1） LPS を腹腔内に単回処置したラットでは、LPS の濃度に依存して DOI 誘発性 WDS が減少した。この効果は１～数時間持続した。LPS による DOI 誘発性 WDS の減少は、オピオイド受容体拮抗薬であるナルトレキソンやシクロオキシゲナーゼ阻害薬であるインドメタシンにより回復した。また、IL-1beta 単回処置後の DOI 誘発性 WDS についても減少した。

（2） NER では、DOI 誘発性 WDS が、ウィスター系ラットに比較して有意に低値であった。しかしながら、NER では、DOI 投与により高率にけいれんが生じ、これはウィスター系ラットに比較して有意に高値であった。しかしながら、受容体結合実験では前頭皮質セロトニン-2A 受容体密度に両系統のラットで差は見られなかった。

（3） 炭酸リチウムを慢性投与した後のラットでは、無処置ラットに比較して有意に AP-1 結合能が亢進していた。また、BDNF 量は炭酸リチウム投与ラットで最大約１５０％に増加していたが、その受容体である TrkB の発現は炭酸リチウム投与でも変化が見られなかった。

（4） beta-エストラジオールやデヒドロエピアンドロステロンおよびデヒドロエピアンドロステロン硫酸エステルは GABA 刺激性、高濃度カリウム刺激性、NMDA 刺激性細胞内カルシウム濃度上昇を抑制した。また beta-エストラジオールによる抑制効果はエストロゲン受容体阻害薬であるタモキシフェンにより回復しなかった。

（5） C６細胞は P450-SCC や 3-beta-HSD を発現させていることが明かとなった。また、培養細胞 C６に抗うつ薬クロミプラミンを前処置した後に、P450-SCC や 3-beta-HSD の mRNA 発現は、両酵素とも前記の抗うつ薬前処置では変化しなかった。

D. 考察

本年度の結果より、セロトニン-2A 受容体機能は LPS や IL-1beta といった急性ストレス負荷により抑制されることが明らかになった。昨年度の結果では、慢性薬理学的ストレス負荷によりセロトニン-２A 受容体機能が亢進した結果が得られている。本年度の結果である急性ストレスによる同受容体機能の抑制は急性ストレスに対する適応反応であると考えられる。一方、慢性ストレスでは、この適応機構が破綻して同受容体機能が亢進したと推測できるかも知れない。昨年度の報告でもあるように、慢性ストレスによる同受容体機能亢進を気分安定薬や ECS が改善したことは、気分障害の病態とその治療薬の作用機序を考慮する上で興味深い。

双極性感情障害では、病相をくり返すに従ってラピッドサイクラーと言われる病相の急激な繰り返しが見られる。一方、キンドリングと言われる現象がてんかんの成因に重要と考えられており、この点で双極性感情障害とてんかんとの類似が指摘されている。また、両疾患とも細胞内カルシウムの異常がその病態と密接に関連しているという仮説が存在する。さらに、いくつかの抗てんかん薬が気分安定薬として有効であるとされている。これらの点から、てんかんモデルラットが気分障害、なかでも双極性感情障害のモデルとなるかどうかについて検討するため、てんかんモデルラットの一つである NER を使用してセロトニン-2A 受容体機能を検討した。NER では、セロトニン-2A 受容体刺激によりけいれんが惹起されたが、WDS はウィスター系ラットに比較して少なく、前頭皮質セロトニン-2A 受容体密度に差は見られなかった。受容体密度が変わらないにも関わらず同受容体関連行動に差が見られたことから、細胞内情報伝達系など受容体以降の経路の違いが行動学的変化をもた

らす可能性が推測される。さらに NER において感情障害と関連深いセロトニン-2A 受容体刺激によりけいれんが惹起されたという本年度の結果や、いくつかの抗けいれん薬が気分安定作用を持つことから、NER が双極性感情障害のモデルとなり得る可能性が推測される。
本年度の検討では、リチウム慢性投与が BDNF を増加させた。この増加に関する分子機構としては、今回の検討でもあるように AP-1 の増加や、他の研究者の報告にある CRE の結合の増加などが関与しているのかもしれない。BDNF 受容体である TrkB の発現はリチウム慢性投与によって変化しなかったが、BDNF が増加していたことから、全体の BDNF 神経伝達としては増加に傾いていると考えられる。BDNF はドパミン、セロトニン、コリンなど様々な神経の生存に関与していると言われている。リチウム慢性処置が BDNF 量を増加させたことは、ストレスによりダメージを受けた神経細胞の生存維持に働き適応破綻を防ぐ働きを持つと考えることができるかもしれない。
神経ステロイドである beta-エストラジオールやデヒドロエピアンドロステロンおよびデヒドロエピアンドロステロン硫酸エステルは GABA 刺激性、高濃度カリウム刺激性、NMDA 刺激性細胞内カルシウム濃度上昇のいずれも抑制したことから、その抑制効果は L 型カルシウムチャンネルを介していることが示唆された。また beta-エストラジオールによる抑制効果はタモキシフェンにより回復しなかったので、これら神経ステロイドによる細胞内カルシウム濃度上昇の抑制はエストロゲン受容体とは独立した作用であると示唆された。以上の結果は、神経ステロイドが神経伝達を調節する機能を有していることを示している。しかも、その調節機能は秒のレベルで発現する non-genomic な速い反応である。脳内のダイナミックな神経伝達を素早く調節する神経ステロイドが存在することは、ストレスに対する適応や感情の変化を考察する上で興味深く、今後の研究の発展が望まれる。
最後に、グリア由来培養細胞である C6 細胞に神経ステロイド合成酵素である P450-SCC や 3-beta-HSD の存在が明らかになったことから、脳内において神経ステロイドがグリア細胞で合成され、パラクライン的あるいは神経伝達物質の放出と同様にグリアから放出されて神経細胞における神経伝達を調節する可能性が示唆される。これまでグリア細胞は脳における支持組織と考えられてきたが、最近になってようやくグリア細胞の機能が論じられるようになって来たところである。本年度の結果もグリアが支持組織だけでなく、神経ステロイドを合成することにより、従来考えられていた以上に積極的に神経伝達に関与していることを示唆している。

E. 結論

うつ病や慢性ストレスによる精神機能変化や行動学的変化において脳内セロトニン-2A 受容体機能およびそれに連関する細胞内情報伝達機能の変化が重要な役割を示すと考えられている。本年度は次のような結果が得られた。LPS や IL-1beta を腹腔内に単回処置したラットでは、DOI 誘発性 WDS が減少した。NER では、DOI 誘発性 WDS が、ウィスター系ラットに比較して有意に低値であったが、NER では DOI 投与により高率にけいれんが生じた。炭酸リチウムを慢性投与した後のラットでは、無処置ラットに比較して有意に AP-1 結合能が亢進し、BDNF 量は最大約１５０％に増加していた。神経ステロイドである beta-エストラジオールやデヒドロエピアンドロステロンおよびデヒドロエピアンドロステロン硫酸エステルは GABA 刺激性、高濃度カリウム刺激性、NMDA 刺激性細胞内カルシウム濃度上昇を抑制した。グリア由来細胞が神経ステロイド合成酵素である P450-SCC や 3-beta-HSD を発現させていることが明かとなった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Y.Uchitomi, A.Kugaya, T.Akechi, et al. (2001) Three sets of diagnostic criteria for major depression and correlations with serotonin-induced platelet calcium mobilization in cancer patients. Psychopharmacol. 153: 244-248.

A.Kagaya, A.Kugaya, M.Takebayashi, et al. (2001) Plasma concentrations of interleukin-1beta, interleukin-6, soluble interleukin-2 receptor and tumor necrosis factor-alpha of depressed patients in Japan. Neuropsychobiol. 43: 59-62.

S.Kouhata, A.Kagaya, S.Nakae, Yoshihiro Nakata and Shigeto Yamawaki (2001) Effect of acute lipopolysaccharide administration on (±)-1-(2,5-dimethoxy-4-iodophenyl)-2 aminopropane-induced wet dog shake behavior in rats: comparison with body weight change and locomotor activity. Prog. Neuro-Psychopharmacol. & Biol. Psychiat. 25: 395-407

Y.Kannan, M.Moriyama, T.Sugano, et al. (2001) Neurotrophic action of interleukin 3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on murine sympathetic neurons. Neuroimmunomodulation 8: 132-141

H.Katagiri, A.Kagaya, S.Nakae, et al. (2001) Modulation of serotonin-2A receptor function in rats after repeated treatment with dexamethasone and L-type calcium channel antagonist nimodipine. Prog. Neuro-Psychopharmacol. & Biol. Psychiat. 25: 1269-1281.

I.Miyoshi, A.Kagaya, C.Kohchi, et al. (2001) Characterization of 5-HT2A receptor desensitization and the effect of cycloheximide on it in C6 cells. J. Neural Transm. 108: 249-60.

K.Kurata, M.Takebayashi, A.Kagaya, et al. (2001) Effect of beta-estradiol on voltage-gated calcium channels in rat hippocampal neurons: a comparison with dehydroepiandrosterone. Eur. J. Pharmacol. 416: 203-212.

Y.Sasaki, H.Hayakawa, A.Kagaya, et al. (2001) Effect of forced running stress on behavior and on brain serotonin system in rats. Biogenic Amines 16: 137-155.

T.Fukumoto, S.Morinobu, Y.Okamoto, et al. (2001) Chronic lithium treatment increases the expression