

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）  
分担研究報告書

感情障害剖検脳の細胞構築学的異常に関する研究

分担研究者 池田 研二 東京都精神医学総合研究所 参事研究員

**研究要旨** 感情障害の神経心理学的研究や脳画像研究等で前頭前野背側部の異常が示されていることに鑑みて、その神経病理学的基盤研究を行った。感情障害剖検脳の検討で、第9野を中心とする前頭葉背側面に皮質体積の有意な減少があることが示された。同領域においてニューロペプチド Y (NPY) mRNA の有意な減少が知られていることから、NPY ニューロンを細胞構築異常の指標として分布を検討した。その結果、感情障害脳で NPY ニューロンは皮質上層に少なく白質深層に多く分布する傾向があり、細胞遊走過程における障害を示唆する所見と考えられた。

A. 研究目的

感情障害の脳画像研究等で明らかにされている前頭前野における機能異常の基盤としての形態学的背景について検討することを目的とする。

B. 研究方法

東京都精神医学総合研究所に保存されている剖検脳のなかから、感情障害8例（躁うつ病6例、退行期うつ病2例、43-69歳、平均年齢61.25歳）、正常対照8例（42-61歳、平均年齢52.38歳）、ハンチントン病4例（50-64歳、平均年齢54.75歳）を選び、第9野を中心とする左側前頭前野検索対象領域とし、以下の検討を行った。1) 20 $\mu$ m厚パラフィン切片に1%チオニン染色し、各症例の皮質幅をNIHイメージにより皮質面積/脳表長比で求め、各群で比較した。2) 上記の感情障害8

例、正常対照6例について、各切片に抗ニューロペプチド Y (NPY) 抗体で免疫染色を行い、i) 皮質上層 (I-III層)、ii) 皮質下層 (IV-VI層)、iii) 白質浅層 (0-800 $\mu$ m)、iv) 白質深層 (800-1600 $\mu$ m)、の4区画に出現するNPY陽性ニューロンを前頭前野脳回壁 谷部の任意に選んだ3箇所（皮質幅3mm）で算定し、各症例について各区画間のNPYニューロン出現比を調べ、感情障害群と正常対照群で比較した。

（倫理面への配慮）

倫理面への配慮であるが、今回、研究に共された剖検脳は厚労省指針のB群試料に相当する。東京都精神医学総合研究所と都立松沢病院の研究倫理委員会で研究承認を得、情報管理者による匿名化操作を経て研究に供した。

### C. 研究結果

皮質幅の3群間の比較では、正常対照群に比して、ハンチントン病で22.6%、感情障害群で16.4%の減少が認められた。いずれも統計学的に有意な減少であった。2) 灰白質体積の減少の基盤として細胞構築の異常が想定されることから、NPYニューロンの分布の比較を行った結果、感情障害群、正常対照群ともに、NPYニューロンは白質浅層に最も多く分布し、次いで、皮質下層、白質深層で、皮質上層での分布が最も少なかった。両群間では感情障害では正常対照に比して、NPYニューロンの分布は皮質上層で少なく、白質深層に多く分布していた。

### D. 考察

うつ状態での行動の抑制、うつ気分や神経心理学的データは前頭前野の障害を示唆している。実際に同領域で脳血流量とグルコース代謝の変化が示されており、画像研究でも感情障害脳で前頭前野の体積減少が報告されている。今回の検討で確認された前頭前野背側部の皮質幅の減少は、第9野を中心とする皮質の体積減少を示すものである。この皮質体積減少の基盤として、神経細胞の大きさや密度の減少、グリア密度の減少や形態変化が報告されているが、今後、神経細胞体、軸索、樹状突起、グリアのいずれに体積減少の責任があるのかが検証されなければならない。

うつ病の脳脊髄液や血漿でNPYレベルの低下が指摘されており、躁うつ病の前頭前野灰白質ではNPY mRNAの有意な減

少が報告されていることから、NPY陽性ニューロンを細胞構築異常の指標として、前頭前野での分布を検討したところ、介在ニューロンであるNPYニューロンは皮質上層にまで至らず、白質深層に留まる傾向が示された。この結果は細胞遊走過程における障害を示唆しており、感情障害では脳の発達過程において障害があり、その結果が前頭前野背側部皮質体積減少として現れていると考えた。

### E. 結論

感情障害脳では第9野を中心とする前頭前野背側部に有意な皮質体積の減少がある。その細胞病理学的な基盤は確定されていないが、発達期の細胞遊走障害を示唆する所見から、脳脆弱性があると考えられる。

### F. 健康危険情報

なし。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

池田研二: 精神分裂病の形態異常. *Current insights in Neurological Science* 9: 10-11, 2001

池田研二: 無症候性病変を神経病理から考える. *老年精神医学雑誌* 12: 15-22, 2001

池田研二, 土谷邦秋, 秋山治彦, 新井哲明, 松下正明: 小阪憲司: ピック病の再検討 ”ピック小体を伴わない葉性萎縮”の位置付け. *神経進歩* 45: 329-341, 2001

Niizato K, Iritani S, Ikeda K, Arai H: Astroglial function of schizophrenic brain: a study using lobotomized brain. *Neuroreport* 12: 1457-1460, 2001

池田研二: 老化と脳. *こころの科学* 100: 88-94, 2001

池田研二, 新井哲明: タウのアイソフォームとグリアの異常. *先端医療シリーズ, 神経・筋疾患の最新医療* 14: 195-199, 2001

Ikeda K, Akiyama H, Arai T, Tuchiya K: Pick body-like inclusions in corticobasal degeneration differ from Pick bodies in Pick's disease. *Acta Neuropathol* 103: 115-118, 2001

Ikeda K: Clinical aspects of argyrophilic grain disease. *Review Series Dementia* 1: 16-17, 2002

Ikeda K, Akiyama H, Arai T, Ueno H, Tuchiya K, Kosaka K: Morphometrical Reappraisal of Motor Neuron System of Pick's Disease and Amyotrophic Lateral Sclerosis with Dementia. *Acta Neuropathol* accepted for publication, 2002

池田研二: 痴呆を伴う ALS と FTD. *Brain Medical* 14: 18-23, 2002

## 2. 学会発表

池田研二, 池田和彦, 上野秀樹, 新里和弘,

中村亮介, 入谷修司, 松下正明: 精神分裂病前頭前野におけるニューロペプチド Y 陽性ニューロンの分布の検討. 第 24 回日本生物学的精神医学会, さいたま, 4 月 12 日, 2002

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

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

躁うつ病における膜受容体からの細胞骨格へのシグナル伝達異常に関する研究

分担研究者 白尾 智明 群馬大学医学部附属行動医学研究施設行動分析学教授

**研究要旨** 本研究の目的は、感情障害の物質的基盤を明らかにするために、躁うつ病患者の脳におけるドレブリン発現・細胞内局在様式を解析することにより、明らかにしようとするものである。本年度は種々の抗ドレブリン抗体を用いて正常脳と患者脳の免疫組織染色を行い、ドレブリンの局在を明らかにした。また、ドレブリン局在の死後変化についての検討を行った。

A. 研究目的

ドレブリンは神経細胞の発達およびシナプス可塑性に重要な役割を果たすと考えられているアクチン結合蛋白である。従来の研究により、ヒト脳においてもドレブリンが発現していることがわかっているが、ヒト脳における細胞内局在様式についての詳細はまだわかっていない。そこで、本研究ではまず、正常ヒト脳におけるドレブリンの局在を免疫組織化学により明らかにする。次に、躁うつ病患者における脳内のドレブリンの局在を免疫組織学的に明らかにし、正常脳と比較することにより、感情障害の細胞レベルあるいはシナプスレベルでの異常を解明し、感情障害の予防・治療のための基礎的データを作製する。

B. 研究方法

抗体作製

ドレブリンN末端の ADFH ドメインに

対する抗体（抗 Dadf）は、ドレブリンの ADFH ドメインの部分が発現するベクターを作製し、大腸菌に目的蛋白を作らせ、それを精製し、それを免疫源としてウサギを免疫し、作製した。一方、ドレブリンE及びAをとともに認識する抗体（抗 DE）はラット脳よりドレブリンEを精製し、それを免疫源としてウサギを免疫し、作製した。

免疫染色法

ヒト脳パラフィン包埋組織より作製した薄切切片は脱パラフィン後、3% BSA in PBS でブロッキング後、一次抗体で一晩インキュベートした。洗浄後二次抗体としてビオチンラベル抗血清を用いて30分インキュベートし、その後ベクタステイン ABC キットを用いて DAB 発色した。

ラット脳の解析には経心的に環流固定を行ったラット脳を凍結包埋後、クライオスタットを用いて薄切切片を作製した。

また、免疫蛍光染色には FITC 標識あるいは TRITC 標識の二次抗体を用いて染色し、蛍光顕微鏡あるいはコンフォーカル顕微鏡にて観察した。

#### (倫理面への配慮)

本研究の実施に際しては、群馬大学昭和地区動物実験委員会の倫理規定に従った。

### C. 研究結果

ドレブリン蛋白の C 末端領域に存在するホーマー結合部位を認識すると考えられるモノクローナル抗体 M2F6 による免疫組織染色では、陽性反応を検出できなかった。そこで、抗 DE および抗 Dadf を用いて免疫染色を行ったところ、神経細胞の細胞体の細胞質に顆粒状の染色を確認できた。また、ニューロピルの領域に点状の染色が見られ、スパイン内のドレブリンが染色されていると考えられた。現在までの観察では、正常脳および患者脳での差異は認められていない。

### D. 考察

従来の研究からモノクローナル抗 (MAb) M2F6 は蛋白分解を受けていない、且つホーマーと結合していないドレブリンのみを認識すると考えられている。従って、今回 MAb M2F6 による染色では染まらず、抗 DE および抗 Dadf による染色で陽性所見が見られたことは、今回調べたヒト脳切片では既にドレブリン局在に関する死後変化が進んでいた可能性があることを示唆している。さらに、神経細胞細胞体に、顆粒状の強い染色象が観察

されたことも上記の可能性を示唆している。

今後は GFP 融合ドレブリン A 発現トランスジェニックマウス脳より調整した初代培養神経細胞系を用いてリアルタイムで、死後変化におけるドレブリンの局在変化を検討する予定である。また同時に、MAb M2F6 の染色の感度を上げる実験も行う。さらに、MAb M2D8 や MAb M2H1 などによる染色も試みて、蛋白分解を受けていないドレブリンのみの局在の解析を進める。

一方、今回の実験ではドレブリン E をドミナントに発現している移動中の神経細胞を発見することはできなかった。今後は側脳室上衣下層を移動中の嗅球顆粒細胞が、多量確認できる場所を重点的に解析する予定である。

### E. 結論

ヒト脳薄切切片を種々の抗ドレブリン抗体により免疫染色した結果、神経細胞の細胞体および樹状突起スパインにドレブリンが存在することがわかった。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

T. Shirao and Y. Sekino "Clustering and anchoring mechanisms of molecular constituents of postsynaptic scaffolds in the spine" *Neurosci. Res.* 40: 1-7 (2001)

Yamazaki, H. Takahashi, T. Aoki and

T. Shirao "Molecular Cloning and Dendritic Localization of rat SH3P7" *Eur. J. Neurosci.* 14: 998-1008 (2001)

M Ikeda, M Segara, Y Sekino, T Shirao, K Honda, T Yoshioka, CN Allen, and S Inoue "The sulphydryl reagent, N-ethylmaleimide, disrupts sleep and blocks A1 adenosine receptor-mediated inhibition of intracellular calcium signaling in the in vitro ventromedial preoptic nucleus." *Neurosci.* 106: 733-743 (2001)

S. Kobayashi, T. Shirao, and T Sasaki "Drebrin expression is increased in spinal motoneurons after axotomy." *Neurosci. Lett.* 311: 165-168 (2001)

Y. Tomidokoro, Y. Harigaya, E. Matsubara, M. Ikeda, T. Kawarabayashi, T. Shirao, K. Ishiguro, K. Okamoto, S.G. Yonkin and M. Shoji. "Brain A $\beta$  amyloidosis in APPsw mice induces accumulation of presenilin-1 and tau." *J. Pathol.* 193: 500-506 (2001)

Mi Jin, S Tanaka, Y Sekino, Y Ren, H Yamazaki, R Kawai-Hirai, N Kojima, and T Shirao "A Novel Brain-Specific Mouse Drebrin: cDNA Cloning, Chromosomal Mapping, Genomic Structure, Expression, and Functional Characterization" *Genomics* (in press)

## 2. 学会発表

Society for Neuroscience 31th Annual Meeting, 2001. H. Takahashi; Y. Sekino; T.

Shirao. "Reversible translocation of actin-binding protein drebrin by glutamate receptor activity in cultured hippocampal neurons"

Society for Neuroscience 31th Annual Meeting, 2001. S. Tanaka; Y. Sekino; T. Shirao "Change of dendritic spine length induced by drebrin A knockdown using antisense oligonucleotide in vitro."

手塚美佳、小田修、西秀夫、永関慶重、西松輝高、小林聡、白尾智明、井上洋「損傷後の細胞反応から見た幼若脳の再生能力」第16回神経組織の成長・再生・移植研究会 2001年6月9日

小林利佳、田中聡一、稲田健、白尾智明、佐治真理 「アンチセンスによるドレブリン発現全脳ノックダウンラットの認知障害」第24回日本神経科学、第44回日本神経化学合同大会 2001年9月26日 - 28日

田中聡一、関野祐子、白尾智明 「樹状突起スパインの形態形成におけるドレブリン A 発現阻害の影響」第24回日本神経科学、第44回日本神経化学合同大会 2001年9月26日 - 28日

高橋秀人、関野祐子、白尾智明「海馬神経細胞におけるアクチン結合蛋白ドレブリンの活動依存的局在変化」第24回日本神経科学、第44回日本神経化学合同大会 2001年9月26日 - 28日

Jie Zhang, 白尾智明、関野祐子 「海馬スライス標本における『forskolin と adenosineA1 受容体拮抗薬の相乗効果』に対する calucium channel 拮抗薬の効果」第24回日本神経科学、第44回日本神経化学合同大会 2001年9月26日 - 28日

張捷、白尾智明、関野祐子「海馬 CA2 領域におけるアデノシン A1 受容体と adenylyl cyclase によるシナプス伝達の調節」第10回海馬と高次機能学会 2001年11月3日 - 4日

高橋秀人、関野祐子、白尾智明 「海馬神経細胞における樹状突起スパインの発生過程とドレブリンとファッシンの局在変化」第10回海馬と高次機能学会 2001年11月3日 - 4日

田中聡一、関野祐子、白尾智明 「ドレブリン A アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いた培養ラット大脳皮質神経細胞樹状突起スパイン形態とシナプス機能解析」第75回日本薬理学会年会、熊本、2002年3月13日 - 15日

山崎博幸、広瀬英司、森望、白尾智明「新規ドレブリン結合タンパク質の探索」第79回日本生理学会大会、広島、2002年3月28日 - 30日

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

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

感情障害の発症脆弱性としての海馬における神経発達障害に関する研究

分担研究者 川戸 佳 東京大学大学院総合文化研究科広域科学 教授  
研究協力者 木本哲也 東京大学大学院総合文化研究科広域科学 助手

**研究要旨** ストレスの標的である海馬で、神経細胞自身がエストラジオールを含むニューロステロイドが合成されることが明らかになった。今後は性ステロイドが体の性器官で合成されて脳に到達して働くというモデルは考え直す必要がある。

A. 研究目的

ストレスがかかると、特に海馬の CA3 細胞層などの神経活動が抑制され、神経細胞死も引き起こされる。これに対し  $17\beta$  エストラジオール（女性ホルモン）は神経細胞を保護する効果がある。しかしこれまでエストラジオールは雌の性器官で合成されて血流に乗って脳に到達し、作用すると考えられてきた。雄の場合はテストステロン（男性ホルモン）が体から脳に達し、そこでエストラジオールに変換されて作用すると考えられている。これに対し、我々の研究室では、海馬の神経細胞自身が局所的にコレステロールからエストラジオールという合成を行なっていることを証明しつつある。この反応にかかわる酵素や合成機構の解析を目的とした。

B. 研究方法

1) ステロイド合成を行なうチトクロム P450 系の蛋白質の抗体組織染色、2)

Western Blotting による蛋白質分子量の確認。3) ステロイド代謝の Radioimmunoassay 解析。4) 放射性ステロイドを基質としたステロイド代謝の HPLC 解析、などの手法を用いた。

C. 研究結果

1) 成獣雄ラットの海馬スライスを用いて抗体組織染色を行なった結果、CA1-CA3 の錐体神経細胞層や DG の顆粒神経細胞層に沿って線状に存在する蛋白質の染色が、チトクロム P450scc、チトクロム P45017  $\alpha$ 、チトクロム P450aromatase、Steroidogenic Acute Regulatory Protein (StAR)、sulfotransferase のいずれに関しても確認できた。

2) 成獣雄ラットの海馬ホモジネートを用いた Western Blotting により、これら全ての酵素は期待される分子量の所に単一バンドが観測された。

3) Radioimmunoassay で測定すると、プレグネノロン、デヒドロエピアンドロス



テロン (DHEA)、エストラジオールなどのニューロステロイド各種は、海馬には血漿 (血中) の 10 倍ほど存在することがわかった。海馬スライスに NMDA で刺激すると、プレグネノロンやエストラジオールの量が 2 倍に増加したことから NMDA 受容体を介する  $\text{Ca}^{2+}$  流入によって、ニューロステロイドが合成されることが分かった。更に HPLC 解析を用いて、 $^3\text{H}$  プレグネノロンから出発して  $^3\text{H}$  DHEA が出来、 $^3\text{H}$  DHEA から出発して  $^3\text{H}$ -エストラジオールが出来ることを発見した。以上の結果から、海馬の神経細胞でコレステロール→プレグネノロン→デヒドロエピアンドロステロン (DHEA) →アンドロステロン→テストステロン→エストラジオールという合成が行なわれていることを発見した。

#### D. 考察

以上の研究成果にもとずき、以下のような研究発展が考えられる。今後はエストラジオールの合成酵素の活性を増強する薬物を見つける。合成されたエストラジオールが神経保護・シナプス伝達活性化を示すための受容体を見つけ、情報伝達過程を解析する。ストレスステロイドによる神経活動の抑制をエストラジオールが回復させる効果があるかどうかを調べ、その分子機構を解明する。

#### E. 結論

ストレスの標的である海馬で、神経細胞自身がエストラジオールを含むニューロステロイドが合成することを明らかにした。このエストラジオール合成は神経

シナプス伝達依存的であった。これはストレスに対する神経保護の新しい治療方法の手がかりとなる。

#### F. 健康危険情報

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

M. Yamada, Y. Ohta, G. I. Bachmanova, A. I. Archakov, I. Hatta and S. Kawato

J. Inorg. Chem. (2001) 83, 261 8

“Effect of Microsome-Liposome Fusion on the Rotational Mobility of Cytochrome P450IIB4 in Rabbit Liver Microsomes”

T. Kimoto, T. Tsurugizawa, Y. Ohta, J. Makino, H. Tamura, Y. Hojo, N. Takata and S. Kawato  
Endocrinology (2001) 142, 3578-3589

“Neurosteroid Synthesis by Cytochrome P450-containing Systems Localized in the Rat Brain Hippocampal Neurons: *N*-Methyl-*D*-Aspartate and Calcium-dependent Synthesis”

S. Kawato, M. Yamada, and T. Kimoto  
Adv. Biophys. (2001) Vol.37, 1-30, Japan Scientific Societies Press, Tokyo

“Neurosteroids are 4th generation neuromessengers: Cell biophysical analysis of steroid signal transduction”

(65) S. Kawato, Y. Hojo, and T. Kimoto  
in CYTOCHROME P450, PART C (2002) (E. F. Johnson and M. R. Waterman, Eds)

“Histological and Metabolism Analysis of

P450 in Brain"

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

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

うつ病におけるグルココルチコイドホルモン受容体異常の検討

分担研究者 渡辺 義文 山口大学医学部高次神経科学講座教授

**研究要旨** 視床下部—下垂体—副腎系のネガティブフィードバック機能において重要な役割を果たしているグルココルチコイドホルモン受容体の $\alpha$ 、 $\beta$  isoform に関し、うつ病患者での $\beta$  isoform の発現比率が低下していることが示唆された。

A. 研究目的

うつ病の遺伝的素因としてストレス脆弱性が想定されている。その根拠となった事実の一つは、うつ病にみられる視床下部—下垂体—副腎(HPA)系の機能異常である。その HPA 系機能異常は視床下部におけるコルチコトロピン遊離ホルモン(CRH)の分泌亢進とグルココルチコイドホルモン(GC)によるネガティブフィードバック機能低下である。

HPA 系ネガティブフィードバック機構において主役を演じる GC 受容体は、細胞質に存在し、GC と結合することにより活性化され、核内に移行し核内標的遺伝子上流に存在する GC response element(GRE)に結合し、その標的遺伝子の発現を調節することが知られている。しかし近年、GC 受容体には alternative splicing により $\alpha$ 、 $\beta$ の2種類の isoform が存在することが報告されている。従来の GC 受容体は $\alpha$ 受容体であり、 $\alpha$ 受容体より35アミノ酸短い $\beta$ 受容体は核内に常時存在し、GC とは結合せず、活性化

された $\alpha$ 受容体の GRE への結合を阻害することが確認されている(C.M. Bamberger et al, J. Clin. Invest. 1995, R.H. Oakley et al, J. Biol. Chem. 1996)。 $\beta$ 受容体のこのような $\alpha$ 受容体阻害作用は、 $\alpha$ 受容体の遺伝子発現調節作用のみならず HPA 系ネガティブフィードバック作用に対してもバランスをとる働きをしているものと想像され、うつ病の HPA 系機能異常という病態生理において $\beta$ 受容体は重要な役を演じているものと考えられる。しかし、うつ病患者における $\beta$ 受容体の検討はこれまで全く行われていない。

本研究ではうつ病の HPA 機能異常における GC 受容体異常を検討することを目的として、GC 受容体の $\alpha$ 、 $\beta$  isoform 発現比率をうつ病患者と健常人との間で比較検討する。

B. 研究方法

健常者4名、うつ病患者4名（単極性2名、双極性2名）を対象として、20ml の採血を行った。血液を低浸透圧で溶血

した後に遠心分離して得られたリンパ球を蛋白変性剤中でホモゲナイズし、RNA分離用スピカラムで遠心分離して総RNAを得た。総RNAを逆転写し、上流は $\alpha$ と $\beta$ に共通の2158-2178番ヌクレオチドを、下流はそれぞれ固有のもので、 $\alpha$ は2616-2635番ヌクレオチドを、 $\beta$ は2503-2523番ヌクレオチドをPCRプライマーとして加え、競合的PCRを行い、それぞれ477bpと366bpのPCR産物を得た。

$\alpha$ と $\beta$ のcDNA量を100:1, 10:1, 1:1, 1:10, 1:100の比で混合し競合的PCRを行い、 $\alpha$ と $\beta$ の量比とサイクル数の関係から検量線を作製し、リンパ球における $\alpha$ と $\beta$ のRNA発現量比を求めた。

(倫理面への配慮)

あらかじめ本研究の目的、方法を文書をもって説明し、同意の得られた者のみを研究対象者とした。その際、目的のGC受容体遺伝子以外の遺伝子については検討しないこと、結果の公表時には個人が特定されないよう配慮することを十分説明し、理解を得た。

#### C. 研究結果

健常者4名のリンパ球の $\alpha/\beta$ 発現量比は、他臓器での報告とほぼ同じ0.13%であった。一方、うつ病患者群の $\alpha/\beta$ 発現量比は0.05%と、健常者に比して著しく低下していた。なお、患者群内の単極性と双極性の間に差は認められなかった。

#### D. 考察

今回は対象数が極めて少なくpreliminaryなものであるが、うつ病患者におけるGC受容体の $\alpha$ 、 $\beta$  isoform発現

比率に異常が存在することが示唆された。 $\beta$  isoformの機能は十分には解明されておらず、今回示唆されたうつ病患者における $\beta$  isoformの発現低下がHPA系のネガティブフィードバック機能低下に結びつくかどうかは不明である。 $\alpha$  isoformによるネガティブフィードバック機構において、 $\beta$  isoformがどのような役割を演じているかは、今後の重要な研究課題と考えられる。

うつ病のHPA機能異常はうつ状態において確認されており、状態の回復とともに改善することが知られている。今回対象としたうつ病患者は全員回復状態にあった。HPA系ネガティブフィードバック機能との関連からも、 $\alpha$ 、 $\beta$  isoform発現比率が病状とともにどのように変化するかを検討することは重要と思われる。

#### E. 結論

少数の検討結果ではあるが、うつ病患者においてGC受容体の $\alpha$ 、 $\beta$  isoform発現比率に異常があることが示唆され、HPA系のネガティブフィードバック機能低下との関連から、興味深い所見と考えられた。

#### F.健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を

含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

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

動物モデルを用いた躁うつ病の再発脆弱性に関する研究

分担研究者 加藤 忠史 群馬大学医学部神経精神医学講座教授

**研究要旨** 本研究の目的は、躁うつ病との関連が見出されている遺伝子の遺伝子改変モデルマウスを用いて、躁うつ病の動物モデルを作成し、このモデル動物を用いて、メタンフェタミンおよびコカインに対する行動感作形成と、神経可塑的变化の関連を明らかにすることである。本研究により躁うつ病のモデル動物が確立し、躁うつ病の脆弱性の分子基盤が理解されれば、これまでの対症療法的な治療薬でなく、より本質的な病態を改善する予防薬の開発が可能となると考えられる。そのため、本年度は、加齢と共にミトコンドリア遺伝子変異が蓄積するトランスジェニックマウスを作成した。

A. 研究目的

躁うつ病（双極性障害）は、再発を繰り返すことにより、社会生活が困難となる疾患であり、その予防が重要となる。躁うつ病には、気分安定薬という有効な予防薬があるが、その効果がない難治性患者が少なくないこと、これらの治療薬には副作用が多く、治療を中断する患者が多いことから、再発する患者が多い。しかしながら、躁うつ病には動物モデルが存在しないため、新たな気分安定薬開発の試みはほとんど行われていないのが現状である。

本研究の目的は、躁うつ病との関連が見出されている遺伝子の遺伝子改変モデルマウスを用いて、躁うつ病の動物モデルを作成し、このモデル動物を用いて、メタンフェタミンおよびコカインに対する

行動感作形成を調べることにより再発脆弱性を検討し、その神経可塑的变化との関連を明らかにするとともに、躁うつ病のモデル動物としての特徴を明らかにし、新規気分安定薬の開発を可能とすることである。

B. 研究方法

ミトコンドリア遺伝子変異を加速させるため、マウスのミトコンドリア遺伝子複製酵素（ポリメラーゼ $\gamma$ 、pol $\gamma$ ）全長cDNAのMg<sup>2+</sup>結合部位に、D181Aという一塩基変異を導入し、その校正活性を失わせた変異体を作成した。これに、calmodulin kinase II  $\alpha$  (CAMKII $\alpha$ )またはneuron specific enolase (NSE)のプロモーターを連結したジーンコンストラクトを作成した。これをリニアライズした後、

C57B6/J マウスの受精卵にインジェクションした。

(倫理面への配慮)

本研究の実施に際しては、理化学研究所脳科学総合研究センター動物実験施設の倫理規程に従った。

### C. 研究結果

CAMKII  $\alpha$ -pol  $\gamma$  マウスは、894 個の卵にインジェクションし、うち 431 個を移植し、27 匹が生まれた。うち、トランスジーンを持つものは、4 匹であった。

一方、NSE-pol  $\gamma$  マウスは、924 個インジェクションし、うち 443 個を移植し、56 匹が生まれた。うち、トランスジーンを持つものは、11 匹であった。

これらのマウスは、現在のところ明らかな行動異常、形態異常は認められていない。これらのマウスを野生型マウスと掛け合わせたところ、いずれも F1 が誕生した。

### D. 考察

校正機能を失わせたマウスポリメラーゼ  $\gamma$  を過剰に発現させるトランスジェニックマウスを作成した。明らかな奇形や行動異常は認めず、F1 の作製が可能であったことから、今後精神疾患モデルとしての解析が可能であると考えられた。

今後、このマウスにおいて、変異 pol  $\gamma$  が標的組織 (CAMKII では海馬・大脳皮質、NSE では神経細胞全般) に発現しているか、これらの組織で mtDNA 変異が蓄積しているかについて、検討する必要がある。

### E. 結論

校正機能を失わせたマウスポリメラーゼ  $\gamma$  を過剰に発現させたトランスジェニックマウスを作成した。今後、このマウスにおいて、mtDNA 変異蓄積という表現型の解析、基礎的な行動実験、アンフェタミンおよびコカインに対する行動感作、大脳皮質におけるセロトニン刺激性カルシウム反応、海馬スライスにおけるシナプス伝達の長期増強などを検討していく予定である。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

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

Kato T, Kunugi H, Nanko S, Kato N (2001) Mitochondrial DNA polymorphisms in bipolar disorder. Journal of Affective Disorders 62: 151-164.

Kato T (2001) Mitochondrial DNA and mental disorders. Molecular Psychiatry 6: 625-633

Kato T (2001) Molecular genetics of bipolar disorder. Neuroscience Research 40:105-113

加藤忠史 (2001) 双極性障害の病因伝説と新たな治療薬の可能性 臨床精神薬

理 4:197-204

なし

加藤忠史(2001) うつ病の遺伝子研究の現状. 医学のあゆみ 197: 453-456

加藤忠史、加藤進昌(2001) ストレスと脳－PTSD をめぐって. 医学のあゆみ 197: 275-277

## 2. 学会発表

笠原和起、加藤忠史：ミトコンドリア DNA 異常が神経特異的に高頻度で蓄積する変異マウスの作製. 第 24 回生物学的精神医学会

Kato T, Ishiwata M (2001) Role of Mitochondria in calcium regulation in transformed lymphoblastoid cells from patients with bipolar disorder. CINP Regional Meeting, Hiroshima, Oct.2, 2001

加藤忠史、渡辺明、松尾幸治、加藤進昌 (2001) 近赤外スペクトロスコピーを用いた双極性障害患者の脳血管反応性の検討 精神疾患関連研究班プログラム 東京 2001年12月

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他



厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）

分担研究報告書

抗うつ薬の奏効機転としての神経回路網再編に関する研究

分担研究者 山田 光彦 昭和大学医学部精神医学教室講師

**研究要旨** 我々はうつ病の病態と治癒機転を理解するために神経新生に加えて神経回路網の再編に注目をしている。分担研究者は、うつ病発症機序および抗うつ薬の奏効機転としての神経回路網再編メカニズムに関与する蛋白質を未知蛋白質も含めてスクリーニングする目的で、抗うつ薬連続投与後にラット脳内で発現量が特異的に変化する mRNA を differential cloning 法を用いて同定し、すでにラット脳から抗うつ薬関連遺伝子・EST 約 300 を同定しており、これらをスポットした独自の cDNA microarray を作成することに成功した。これらの候補遺伝子群の一部が軸索の伸展・退縮の調節、神経伝達物質の開口放出に関与する分子クラスターに分類されることが明らかとなった。さらに、これらの候補遺伝子群が神経回路網の再編といった神経可塑的变化に重要な役割を果たしていることを培養神経細胞をモデルに証明した。分担研究者が行った一連の研究は、神経回路網の再編成といった神経可塑的变化における機能の検討を通して、主任研究者が行う「感情障害の発症脆弱性としての神経発達・神経再生機能障害に関する基礎的研究」に寄与するものと考えられた。

A. 研究目的

我々は、differential cloning 法を用いて抗うつ薬の奏効機転に関連する遺伝子・EST を探索するプロジェクトを開始している。現在までに、約 300 個の候補遺伝子をラット前頭葉皮質から同定し、antidepressant related genes (ADRGs) と名付けて検討を進めている。これら候補遺伝子の機能別クラスタリングを試みた結果、既知遺伝子と高相同性を示した ADRG 遺伝子群の一部は、神経細胞において軸索の伸展、退縮の調節、神経伝達物質の開口放出に

関与する分子クラスターに分類されることが明らかとなった。そのため、これらの候補遺伝子群が神経回路網の再編といった神経可塑的变化に重要な役割を果たしている可能性が高いと考えられた。そこで本研究では、抗うつ薬の奏効機転において神経回路網の再編が重要であるという仮説について検証を行うべく研究を進めることを目的とした。

B. 研究方法

(1) 抗うつ薬の奏効機転に関わる新規標

## 的分子の探索

新規遺伝子を含めた探索には、蛍光 differential display 法を工夫した独自の differential cloning 法を用い mRNA レベルで調査した。候補遺伝子・EST の 2 次スクリーニングには、我々が独自に開発した ADRG microarray プロトタイプに改良を加えながら随時検討した。スライドガラス上へのスポットティングは、GMS417 Arrayer 用い、各処置群から抽出した mRNA サンプルをもとに Cy3/Cy5 でラベルした cDNA 蛍光プローブを用いてハイブリダイゼーションを行った後に、GMS418 Scanner を用いてシグナルを検出し画像解析した。

得られた cDNA 断片は、サブクローニングした後にジデオキシ法により塩基配列を決定した。次に、GeneBank/ENBL のデータベースに登録されている塩基配列と FASTA 法を用いて相同性解析を行い発現プロフィールおよび機能別に分類した。さらに、plaque hybridization 法、3'-5'-RACE 法を用いて cDNA 全長の塩基配列を得た。次いで、得られた候補分子のモチーフ解析を行い予想される生理活性について検討した。

### (2) 神経突起・軸索の伸展や退縮機構における ADRG の役割についての検討

神経回路網再編成といった神経可塑的变化の関与を検討するため、神経突起・軸索の伸展・退縮調節機構に注目しアッセイ系の構築を試みた。実際には、培養神経系細胞および神経成長因子により神経細胞用に分化させた PC12 細胞に候補 ADRG 遺伝子と GFP 遺伝子を共発現させたモデル（機能強化モデル）を用いて蛍

光顕微鏡画像解析を行った。さらに、抗 ADRG 抗体をトランスフェクションしたモデル（機能抑制モデル）を用いて同様の検討を行った。

### (3) 神経伝達物質の開口放出機構における ADRG の役割についての検討

神経回路網再編成といった神経可塑的变化の関与を検討するため、シナプスにおける神経伝達物質の開口放出機構に注目したアッセイ系の確立を試みた。リアルタイム多光子レーザー走査蛍光顕微鏡を用いて開口放出機構の可視化を検討するための予備的実験として、神経成長因子により神経細胞様に分化させた PC12 細胞にトリチウムでラベルしたノルアドレナリンを取り込ませ、高濃度カリウム刺激によるノルアドレナリンの開口放出レベルの検討を行った。実際の検討は、培養細胞に抗 ADRG 抗体をトランスフェクションしたモデル（機能抑制モデル）を用いて解析を行った。

## C. 研究結果

### (1) 抗うつ薬の奏効機転に関わる新規標的分子の探索

differential cloning 法を用いて種々の抗うつ薬を慢性投与した実験動物の脳から各薬物に共通した反応を示す新規遺伝子・EST を約 300 同定した。我々が同定した cDNA 断片には、神経情報伝達、細胞内情報伝達系に関する分子群、タンパク質折り畳み、細胞内輸送に関する分子群、細胞障害、酸化還元系に関する分子群などの既知遺伝子群とともに、熱ショック蛋白である HSC70 の新規スプライシングバリエーションや、既知の分子と相同

性の低い未知の機能的分子群が多数含まれていた。さらに、これらの候補分子群の中には神経突起・軸索の伸展や退縮、神経伝達物質の開口放出機構といった神経可塑的变化に機能的に関わるものが複数存在していた。

また、ADRG microarray を用いて ECT を模した処置を負荷したラットのサンプルを解析した結果、抗うつ薬および ECT という異なる 2 種の治療法施行後に共通して発現変化する遺伝子を多数発見することに成功した。これら ADRG 遺伝子群はうつ病治療過程に共通する分子メカニズムに関与する可能性が考えられ、今後の詳細な検討が待たれる。

### (2) 神経突起・軸索の伸展や退縮機構における ADRG の役割についての検討

我々がこれまでに明らかとしてきた抗うつ薬関連遺伝子 (ADRG) の一部が神経可塑性の変化 (神経突起・軸索の伸展・退縮調節等) に関与する遺伝子群に属することが明らかとなった。そこで、候補遺伝子と GFP を培養神経系細胞にトランスフェクションし強制発現させ、神経突起長、神経突起数を計測した。

GFP-ADRG15 を強発現させた細胞 (機能強化モデル) は透過像で見ると神経突起を伸長していた。一方、GFP-ADRG15 を発現を発現していない細胞では、透過像で見ると突起を伸長していなかった。一方、ADRG14 を強発現させた細胞は透過像で見ると神経突起を伸長していなかったが、抗 ADRG14 抗体をトランスフェクションした条件下 (機能抑制モデル) においては神経突起の伸長が有意に抑制された。

### (3) 神経伝達物質の開口放出機構における ADRG の役割についての検討

神経回路網再編成といった神経可塑的变化の関与を検討するため、シナプスにおける神経伝達物質の開口放出機構に注目したアッセイ系の確立を試みた。神経成長因子により神経細胞様に分化させた PC12 細胞に抗 ADRG14 抗体をトランスフェクションした条件下 (機能抑制モデル) において、トリチウムでラベルしたノルアドレナリンを取り込ませ、高濃度カリウム刺激による検討を行ったところ、ノルアドレナリンの開口放出の有意な抑制を確認することが出来た。ADRG14 は SNARE-complex に関与する可能性が高く興味を持たれる。

### D. 考察

本研究において、我々は種々の抗うつ薬を慢性投与した実験動物の脳から各薬物に共通した反応を示す新規遺伝子・EST を約 300 同定した。これらの候補分子群の中には神経突起・軸索の伸展や退縮、神経伝達物質の開口放出機構といった神経可塑的变化に機能的に関わるものが複数存在していた。神経伝達物質開口放出や他の神経可塑的变化に関わる基礎研究は盛んに行われているが、ストレスやうつ病などの高次精神機能障害との関連についての報告は未だ少ない。抗うつ薬、電気刺激療法、rTMS (経頭蓋磁気刺激療法) などの各種うつ病治療法の負荷後に候補分子の機能や発現がどのように変化するかを検討することにより、うつ病の奏効機転に関与する候補分子をより絞り込んで探索することが可能であると思わ

れる。今回我々は、抗うつ薬関連遺伝子をスポットした独自の cDNA microarray を作成することに成功した。我々が開発した cDNA microarray は、抗うつ薬、他のうつ病治療法、種々の情動障害モデル、ストレスモデルにおける遺伝子発現変化を効率良くスクリーニングするためのできる強力なツールになると考えられた。また、本研究によって得られた機能分子を創薬ターゲットとしその機能を阻害したり修飾する化合物を新規抗うつ薬候補として開発することが可能となると考えられた。そのためには、特に興味深い候補遺伝子についてヒトホモログの塩基配列を決定することを試み、実験動物から得られた知見をヒトへと外挿していく必要があると考えられた。

#### E. 結論

分担研究者が行った一連の研究は、神経回路網の再編成といった神経可塑的変化における機能の検討を通して、主任研究者が行う「感情障害の発症脆弱性としての神経発達・神経再生機能障害に関する基礎的研究」に寄与するものと考えられた。

#### 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

Yamada M, Yamada M, Yamazaki S, Takahashi K, Nara K, Ozawa H, Yamada S, Kiuchi Y, Oguchi K, Kamijima K, Higuchi T, Momose K, Induction of cysteine string protein after chronic antidepressant

treat-ment in rat frontal cortex. *Neuroscience Letters*, 2001, 301:183-186

Yamada M, Higuchi T, Functional genomics and antidepressant research. *European Neuropsychopharmacology* (in press), 2002

Yamada M, Takahashi K, Tsunoda M, Nishioka G, Kudo K, Ohata H, Kamijima K, Higuchi T, Momose K, Yamada M, Differential expression of VAMP2/synaptobrevin-2 after antidepressant and electroconvulsive treatment in rat frontal cortex. (submitted for publication), 2002

Yamada M, Iwabuchi T, Takahashi K, Tsunoda M, Nishioka G, Kudo K, Ohata H, Momose K, Higuchi T, Yamada M, A frizzled protein and its signal transduction cascade as a novel molecular target for antidepressant and lithium treatment in rat frontal cortex. (submitted for publication), 2002

##### 2. 学会発表

Takahashi K, Yamada M, Hirano M, Nishioka G, Kudo K, Kamijima K, Momose K, Yamada M, Expression of two novel splice variants for putative rat ndr2 gene after chronic treatment with antidepressant and ECT. *Neuroscience Meeting*, San Diego, 2001

Kudo K, Yamada M, Yamada M, Yamazaki S, Takahashi K, Nishioka G, Hashiguchi T, Fukuzako H, Takigawa M, Higuchi T,