

20020847

厚生労働科学研究費補助金  
こころの健康科学研究事業

感情障害の発症脆弱性素因に関する神経発達・神経新生的側面からの  
検討並びにその修復機序に関する分子生物学的研究  
(課題番号 H14-こころ-004)

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 三國雅彦  
(群馬大学医学部神経精神医学講座)

平成15年3月

## 目 次

I.	総括研究報告書	-----	1
	「感情障害の発症脆弱性素因に関する神経発達・神経新生的側面からの検討並びにその修復機序に関する分子生物学的研究」		
	群馬大学医学部神経精神医学講座 三 國 雅 彦		
II.	分担研究報告書		
1.	「感情障害の発症脆弱性の分子基盤と病態形成機序の解明に関する研究」	-----	7
	群馬大学医学部神経精神医学講座 三 國 雅 彦		
2.	「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」	-----	11
	群馬大学医学部附属行動医学研究施設行動分析学部門 白 尾 智 明		
3.	「海馬でのニューロステロイド合成と作用に関する研究」	-----	16
	東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻 川 戸 佳		
4.	「神経ステロイドの脳波学的解析」	-----	19
	国立精神・神経センター精神保健研究所精神生理部 内 山 真		
5.	「恐怖条件付け反応と神経細胞の再生における成育環境の解析」	-----	30
	山梨大学医学部精神神経医学教室 神 庭 重 信		
6.	「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」	-----	32
	山口大学医学部高次神経科学講座 渡 辺 義 文		
7.	「感情障害剖検脳の細胞構築学的研究」	-----	36
	東京都精神医学総合研究所老年精神医学研究部門 池 田 研 二		
8.	「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」	-----	39
	理化学研究所脳科学総合研究センター精神疾患動態研究チーム 加 藤 忠 史		
9.	「抗うつ療法の奏功機転候補分子の機能的評価と神経可塑的変化の可視化に関する研究」	-----	41
	昭和大学医学部精神医学教室 山 田 光 彦		
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	-----	47
IV.	資 料	-----	49

## こころの健康科学研究事業

### 総括報告書

感情障害の発症脆弱性素因に関する神経発達・神経新生的側面からの検討並びに  
その修復機序に関する分子生物学的研究

主任研究者 三國雅彦 群馬大学医学部神経精神医学講座 教授

**研究要旨：**本研究では感情障害発症脆弱性に関する分子機序を遺伝的要因と養育環境要因などの神経発達に関連する側面から明らかにするとともに、ストレスやホルモン変調による神経ネットワーク機能維持機構の障害や神経新生機能の障害と関連する分子基盤を明らかにする。さらにこれらのストレス脆弱性の分子基盤をもとにしていかに感情障害が形成されるかに関する分子病態生理を解明し、その修復機序を解明することによって根治的な薬物療法の開発の糸口を得る研究を推進することを目的としている。

本年度の研究成果を要約すると、抗うつ薬療法で抑うつ症状が改善すると脳画像学的解析でも改善の見られる左前頭前野プロードマン 9 野の第二層に小型神経細胞密度の低下という器質的な変化があることがわかり、脆弱性の脳部位の一つであることが明らかになった。次に抗うつ薬療法で症状が改善しても脳画像学的解析では改善せず、素因的な変化と考えられる脳部位の一つである右上側頭回のグルコース取り込みが、がん罹患後に大うつ病エピソードや不安を伴う適応障害を起こした臨床例では、起こさなかった症例に比して、精神症状発現前から有意に低下していることを見出し、この部位も脆弱性の脳部位の一つであることが明らかになった。神経発達やシナプスの形態形成・維持に関与するタンパク質の一つである、ドレプリンの免疫組織化学的解析を死後脳で検索するために、ドレプリンに対する新たな抗体を作成した。また、視床下部一下垂体—副腎皮質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受容体の $\alpha$ と $\beta$ の isoform の発現比率をヒトリンパ球で検討したところ、感情障害では $\beta$  isoform の発現比率が低下しているが、この変化はうつ状態の改善とは相関せず、素因的な指標である可能性が示唆された。一方、胎生期ストレス負荷ラットを用いたストレス脆弱性に関わる遺伝子群の同定を行い、CRH 受容体遺伝子や *fyn* 遺伝子などが候補となることが明らかとなった。出生早期の母子分離ストレスによっても不安水準の高い仔ラットになるが、このストレス負荷

からの解放後の母ラットの養育行動の相違によって逆に不安水準の低い仔ラットとなることも明らかになった。また、ミトコンドリア遺伝子変異を加速したマウスを作成することに成功し、躁うつ病の病態モデルとなるか、否かが現在検討されている。抗ストレス作用、抗うつ作用の新規の作用機序研究も着々と進められ、抗ストレス作用が注目される神経ステロイド合成の各ステップがラット海馬において実証され、関与する酵素も免疫組織化学的に明らかにされた。さらに神経ステロイドの作用を睡眠脳波解析に証明しようとする臨床的試みも開始された。新規の抗うつ作用の奏効機転として神経伝達物質の開口放出機構や神経突起進展などの可塑的な変化も見い出されるとともに、グルココルチコイド受容体の核内移行促進と核内転写抑制作用も新たに発見された。

#### 分担研究者

- 三國 雅彦 (群馬大学医学部神経精神医学講座教授)
- 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)
- 内山 真 (国立精神・神経センター精神保健研究所神経生理学部門部長)
- 川戸 佳 (東京大学大学院総合文化研究科広域科学教授)
- 神庭 重信 (山梨大学医学部神経精神医学講座教授)
- 渡辺 義文 (山口大学医学部高次神経科学講座教授)
- 池田 研二 (東京都精神医学総合研究所老年精神医学研究部門 参事研究員)
- 加藤 忠史 (理化学研究所脳科学総合研究センター精神疾患動態研究チームリーダー)
- 山田 光彦 (昭和大学医学部精神医学教室講師)

## A. 研究目的

脳科学の研究の発展に支えられて躁うつ病などの感情障害の病因研究や病態研究が推進されてきているが、今なお、病態形成の分子機序は解明されておらず、進歩を遂げてきた抗うつ薬療法も根治的な療法とはなっていない可能性がある。感情障害の初発年齢のピークは20歳代と50歳代にあること、ストレスを誘因として発症することが臨床精神医学的に明らかにされているが、その発症誘因となるストレスは誰もが経験するようなライフ・イベントであるので、ストレスに対する脆弱性が神経系の発達期や退行期に形成されている個人に、ストレスが作用すると感情障害が発症すると考えられる。そこで、このストレス脆弱性の生物学的基盤の解明と、ストレスが作用して形成される感情障害の病態生理の解明とが求められている。

感情障害の病態は完全寛解する臨床経過から考えて、これまで組織学的変化は伴わないと考えられてきたが、大脳皮質層構造や細胞構築などの神経発達障害を示唆する異常が存在する可能性を示唆する成績が得られつつある。したがって、この病態の解明には機能的脳画像を用いた解析を進めると同時に死後脳の解析を進めることが重要となってきた。また、ストレスに対処する生体防御機構に関連する遺伝子やタンパク質レベルの解析も重要となってくる。一方、退行期に初発する感情障害の症例ではそれまでにストレス性刺激に曝されていても発症しなかったことになるので、神経発達障害と関連するストレス脆弱性因子の関与よりも、むしろ中年以降の神経ネットワーク機能維持機構や神経新生機能がホル

モン変調や反復するストレス因などによって障害されて感情障害の発症脆弱性を形成している可能性がある。

本研究では感情障害発症脆弱性に関する分子機序を遺伝的要因と養育環境要因などの神経発達に関連する側面から明らかにするとともに、中年以降のストレスやホルモン変調による神経ネットワーク機能維持機構の障害や神経新生機能の障害と関連する分子基盤を明らかにする。さらにこれらのストレス脆弱性の分子基盤をもとにしていかに感情障害が形成されるかに関する分子病態生理を解明し、その修復機序を解明することによって根治的な薬物療法の開発の糸口を得る研究を推進することを目的としている。

## 発症脆弱性に関する臨床的研究

三國らは感情障害の発症脆弱性について臨床的並びに基礎的な検討を行った。抗うつ薬療法で改善しても脳画像学的解析では改善せず、素因的な変化と考えられる脳部位の一つである右上側頭回のグルコース取り込みが、がん罹患後に大うつ病エピソードや不安を伴う適応障害を起こした症例では、起こさなかった症例に比して、精神症状発現前から有意に低下していることを見出した。まだ、予備的研究の段階で、現在進めている前方視的研究で確認される必要があるが、発症脆弱性の脳部位の一つである可能性があることになり、期待のもてる結果である。この部位は顔の認知や恐怖体験の認知に関与する部位として知られており、今年の *Biol. Psychiat* に報告された MRI 研究では幼児虐待をうけたこどもの上側頭回の

灰白質容積が受けなかったこどもより大きく、特に右側で顕著であるといい、過剰なシナプスの刈り込み機能が障害されたためではないかと考察されている。

池田らは感情障害死後脳の左ブロードマン9野での皮質幅の低下と皮質第二層の小型神経細胞密度の低下という新知見を得たが、この部位は三國らが感情障害のPETを用いた脳画像解析で明らかにした糖代謝の低下部位であり、抗うつ療法で症状が改善するとこの低下も改善することを明らかにした部位である。したがって、この池田らの知見は糖取り込み低下という機能的障害の基盤に器質的な異常が感情障害では存在することを示唆していることになり、大変興味深い知見であるといえる。これまでも感情障害死後脳で前頭葉背側に皮質体積の有意な減少があり、本研究で認められた皮質幅の低下と一致する所見であるが、その細胞構築学的要因としてグリア細胞密度の減少、神経細胞密度の減少、神経細胞サイズの低下などが報告されている。しかし、池田らの検討ではグリア細胞や神経細胞の密度、神経細胞のサイズに変化が無く、皮質第二層の小型神経細胞密度の有意な低下を明らかにしたもので、感情障害脳では介在ニューロンの機能障害が存在することになる。

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るアクチン結合タンパク質であるドレブリンの発見者である白尾らは、ヒト脳内のドレブリンの分布を明らかにするため、従来の抗ドレブリン抗体(M2F6モノクローナル抗体)で免疫組織染色をおこなったが、

ヒト脳のパラフィン切片標本には適さないことがわかった。そこで、免疫組織化学的解析に適した抗ドレブリン抗体、抗リン酸化ドレブリン抗体および抗ドレブリン結合タンパク質抗体を種々作成し、ヒト脳、ラット脳の免疫組織染色を行っている。その結果、ドレブリンAの特異的配列に対する抗体(抗DA2)が有用となる見込みが立ちつつある。

渡辺らは視床下部一下垂体—副腎皮質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受容体の $\alpha$ と $\beta$ の isoform の発現比率をヒトリンパ球を用いて検討したところ、感情障害では $\beta$  isoform の発現比率が健常者に比較して低下していることを見出した。この変化はうつ状態の改善とは相関せず、素因的な指標である可能性が考えられるといい、大変興味深い知見であるが、核内に存在する $\beta$  isoform の役割が不明であるため、この異常でどのような遺伝子の発現に影響しているかの検討が今後の課題となっている。

感情障害の病態に関する動物モデル研究

三國らは胎生期ストレス負荷ラットがデキサメサゾン非抑制とストレス不適応性を示すことをすでに明らかにしてきたが、DNAチップを用いて、胎生期ストレス負荷後の成獣ラット海馬に特異的に発現量の異なる遺伝子群の同定を行い、CRH受容体遺伝子やfyn遺伝子などが候補となることを明らかにした。もちろん、PCRによって確認される必要があり、現在その解析をおこなっている。発現が低下する遺伝子の中にはCRH受容体遺伝子

があるが、脳内の CRH が過剰であることに対する適応的变化と考えられる。fyn のノックアウトで神経発生過程の障害に基づく神経細胞の移動の異常が起こることが知られているので、発症脆弱性因子の分子基盤を解明する上で、fyn 遺伝子の発現低下が観察されたことは興味深い知見であるといえる。

神庭らは Wistar/st 系ラットと S-D 系ラットに対し、出生早期の母子分離ストレス負荷を行い、不安耐性を評価したが、S-D 系ラットでは母子分離群で不安行動が増加し、従来の報告が確認された。しかし、Wistar/st 系ラットでは母子分離群で不安行動がむしろ低下し、その原因として、母子分離後の母親の養育行動の違いが考えられた。すなわち、Wistar/st 系ラットは母子分離ストレス負荷後に Arched-back nursing 行動が増加したが、S-D 系ラットでは逆に減少した。別系統のラットでの結果であるので遺伝的背景による影響も否定できないが、出生早期のストレスの影響がその後の母親の養育行動によって救済できる可能性をも示唆している。その分子メカニズムの解明が待たれる。

加藤らは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することを目指している。加藤らはこれまでに MRS 解析を用いて躁うつ病脳内でのクレアチンリン酸の低下所見を明らかにし、ミトコンドリアでのエネルギー代謝異常の存在を指摘する一方、ミトコンドリア DNA の欠失や多型と躁うつ病発症との関連を明らかにしてきた。そこで、ミトコンドリア遺伝子変異を加速させるために

ミトコンドリア遺伝子複製酵素に一塩基変異を導入し、校正活性を失わせた変異体を作成する研究に従事してきた。ようやく、海馬および大脳皮質で欠失型ミトコンドリア DNA の存在を確認できた。現在、行動や生体リズムに異常があるか、否かを観察中である。

#### 抗ストレス、抗うつ作用の新規作用機序

ストレス負荷で海馬 CA3 の神経細胞活動が抑制され、ホルモン変調などの条件下では神経細胞死も引き起こされるが、17- $\beta$ -エストラジオールは神経保護作用を有し、難治性うつ病に対する抗うつ療法にも適応されている。川戸らは海馬の神経細胞自身が局所的にコレステロールから 17- $\beta$ -エストラジオールを合成していることをほぼ証明した。これまでコレステロールから複数の神経ステロイドが合成されていることは知られていたが、グリア細胞で作られているといわれてきた。しかし、川戸らは免疫組織学的に海馬の神経細胞であることを証明した。また、HPLC を用いた解析で、コレステロールからプログネロン、プログネロンからデヒドロエピアンドロステロン、デヒドロエピアンドロステロンからエストラジオールを合成していることと、アンドロステロンからテストステロン、テストステロンからエストラジオールを合成していることも証明した。併せて、それぞれの段階に関与する酵素も免疫組織学的に証明している。ストレスから神経細胞を保護する新規薬物療法の可能性がみえてきているといえる。

内山らはヒトにおける神経ステロイドの作用を明らかにするため、睡眠脳波解

析と獲得技能の睡眠後の改善とを指標に研究を行っている。本年度は実験系の確立に努めるとともに、神経ステロイドの作用点である GABA-A 受容体塩素イオン複合体に作用するベンゾジアゼピン系睡眠導入剤を睡眠前に投与し、視覚弁別課題で獲得した技能の睡眠後の改善がみとめられるか、否かを検討している。

山田らは抗うつ療法の奏効機転に関わる分子を differential cloning 法で同定し、それらの遺伝子をスポットした cDNA microarray を作成することに成功していたが、今年度はそれらの奏効機転に関わる分子の機能的評価を行った。その特異抗体を PC12 細胞に導入し、内在性のその遺伝子の機能を抑制すると、神経突起長および神経突起数の減少、ノルアドレナリンの開口放出の抑制が観察されることを明らかにした。したがって、抗うつ療法がこの神経突起長および神経突起数の調節、神経伝達物質の開口放出機能に関与していることを示唆しており、興味深

い研究結果であるといえる。また、山田らの開発した cDNA microarray が新規抗うつ薬のスクリーニング法となる可能性もあることになる。

三國らは三環系抗うつ薬 (TCA)、SSRI、SNRI、MAO-I などが共通して、100nM の濃度でヒトリンパ球の細胞質にあるグルココルチコイド受容体 (GR) を核内に移動させる作用があり、この効果は抗精神病薬や抗不安薬にはない作用であることを見出した。しかも、COS 細胞に GR 遺伝子の 5' 上流とレポーター遺伝子を導入し、転写活性を測定すると抑制していることを発見した。これらの成績は海馬における GR の発現増加を抗うつ薬が引き起こすことで、HPA 系を抑制して抗うつ効果を発揮しているという説に一見矛盾するようであるが、末梢組織でも抗うつ薬が GR の発現増加を起こすとすると、かえってクッシング症候群を起こすことになってしまうので、この成績は貴重な発見といえる。

こころの健康科学研究事業  
分担研究報告書

感情障害の発症脆弱性の分子基盤と病態形成機序の解明に関する研究

分担研究者 三國雅彦 群馬大学医学部神経精神医学講座 教授

**研究要旨：**感情障害の発症脆弱性に関連する脳部位を脳画像解析により同定するとともにストレス脆弱性モデル動物を用いて脆弱性素因に関連する分子群の検索を行った。抗うつ薬療法で臨床症状が改善しても脳画像学的解析では改善せず、うつ病の素因的な変化と考えられる脳部位の一つである右上側頭回のグルコース取り込みが、がん罹患後に大うつ病エピソードや不安を伴う適応障害を起こした臨床例では、起こさなかった症例に比して、それらの精神症状発現前から有意に低下していたことを見出した。この結果はまだ、予備的研究の段階であり、現在進めている前方視的研究で確認される必要があるが、発症脆弱性の脳部位の一つである可能性が高いことになる。また、胎生期ストレス負荷ラットがデキサメサゾン非抑制とストレス不適応性を示すことをすでに明らかにしてきたが、DNAチップを用いて、胎生期ストレス負荷後の成獣ラット海馬において特異的に発現量の異なる遺伝子群の同定を行い、CRH受容体遺伝子や *fyn* 遺伝子などが含まれることを明らかにした。

A. 研究目的

感情障害はストレスを誘因として発症することが明らかにされているが、その発症誘因となるストレスは誰でもが経験するようなライフ・イベントであるので、ストレスに対する脆弱性が神経系の発達期や退行期に形成されている個人に、ストレスが作用すると感情障害が発症すると考えられる。そこで、このストレス脆弱性の生物学的基盤の解明並びにストレスが作用して形成される感情障害の病態生理の解明が大きな課題となっている。われわれは昨年までに、未治療感情障害のPETを用いた脳画像解析を行い、左前

頭前野での糖代謝の低下が最も有意であり、抗うつ療法で症状が改善するとこの低下も改善することを明らかにした。一方、治療前に低下を示す右上側頭回は治療による症状の改善後も低下したままであり、素因的な変化部位である可能性を指摘した。また、この右上側頭回での低下は大うつ病エピソードだけでなく、がん罹患後の不安を伴う適応障害でも認められた。そこで、感情障害や不安障害などの精神症状の発現前から右上側頭回でのグルコース取り込み低下が存在するか、否かを明らかにすることが本研究の目的の一つである。

また、日本人のうつ病でもデキサメサゾンと CRH を組み合わせた検査では欧米人とほぼ同様に、約 70% が非抑制であること見出したが、症状改善とともに抑制にシフトし状態依存的な変化である。しかし、胎生期ストレス負荷ラットがデキサメサゾン非抑制とストレス不適應性を示すことをすでに明らかにしてきたように、素因的な要素が含まれている可能性がある。そこで、視床下部—下垂体—副腎皮質系を抑制的に支配する上位中枢である海馬における遺伝子の発現量を DNA チップを用いて解析し、胎生期ストレス負荷後の成獣ラットに特異的な変動を示す遺伝子群を同定することが第二の目的である。

## B. 研究方法

2001 年 4 月から 2002 年 3 月までの一年間に当科を受診して、がん罹患後の大うつ病エピソードか不安を伴う適應障害と診断され、かつ、当科受診前にかん転移検索のために全身の FDG-PET 検査を受けていた 6 症例と、無作為に抽出されたがん患者でカルテや看護記録からみてうつ病や適應障害を起こしていなかった 11 症例の FDG-PET 画像について SPM 解析を行い、有意差のある脳部位を検索した。

次に、ラット海馬において発現している遺伝子を cDNA ライブラリーより網羅的に取得し、これをもとに約 10000 の cDNA からなるマイクロアレイを作成しているが、まだ、完成していないので、GENETEC 製の、約 1000 の cDNA からなるマイクロアレイを用いて、ストレス脆弱性モデルラットとコントロールの海馬

から mRNA を抽出し、それぞれ別の色の蛍光色素でラベルして競合的にハイブリダイゼーションさせ、蛍光の強さの違いを読むことで遺伝子の発現量の違いを検索した。

## (倫理面への配慮)

群馬大学医学部臨床試験委員会の承認を得たプロトコールにしたがって研究を進めており、同意の得られた研究協力者についてのみ解析している。

## C. 研究結果

がん罹患後に大うつ病エピソードや不安を伴う適應障害を起こした症例では起こさなかった症例に比して、精神症状発現前から右上側頭回のグルコース取り込みが有意に低下していることが観察された。また、胎生期ストレス負荷後の成獣ラット海馬に特異的に、発現量の低下していた遺伝子群が 10 個、その中には CRH 受容体遺伝子や *fyn* 遺伝子などが含まれており、一方、発現量の増加していた遺伝子も 2 個同定された。

## D. 考察

この予備的な臨床研究をうけて現在進められている前方視的な研究によって確認される必要があるが、発症脆弱性の責任脳部位の一つとして右上側頭回が抽出されたことは期待のもてる結果である。この部位は顔の認知や恐怖体験の認知に関与する部位として知られており、昨年の *Biol. Psychiat* に報告された MRI 研究では幼児虐待をうけたこどもの上側頭回の灰白質容積が受けなかったこどもより大きく、特に右側で顕著であったといい、

過剰なシナプスの刈り込み機能が障害されたためではないかと考察されている。

また、胎生期ストレス負荷後の成獣ラット海馬に特異的に発現量の低下していた遺伝子群や増加していた遺伝子群が同定されたが、PCR によって確認される必要があり、現在その解析をおこなっている。発現が低下する遺伝子の中には CRH 受容体遺伝子があるが、脳内の CRH が過剰であることに対する適応的变化と考えられる。一方、fyn のノックアウトマウスでは神経発生過程の障害に基づく神経細胞の移動に異常があることが知られているので、発症脆弱性因子の分子基盤を解明する上で、fyn 遺伝子の発現低下が観察されたことは興味深い知見であるといえる。

#### E. 結論

まだ予備的な臨床研究ではあるが、発症脆弱性の責任脳部位の一つとして右上側頭回が抽出された。また、ストレス脆弱性モデル動物の海馬では特異的に発現量の低下していた遺伝子群や増加していた遺伝子群が同定され、この中には CRH 受容体遺伝子や fyn 遺伝子などが含まれていた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Masahiko Mikuni, Katsuki Kitera, Katsumasa Muneoka, Kazuko Saitoh, Chihiro Yamazaki, Takehiko Majima,

Itsuro Ida, Yoshibumi Watanabe. Relationship between Vulnerability of Major Depressive Disorder and Prenatal Stress or Glucocorticoid Treatment. In: Recent Advances in the Research of Affective Disorder in Japan, ed. By T. Okuma, S. Kanba, Y. Inoue, pp. 43-49, Elsevier Science, 2002

2. Toru Uehara, Kazuo Takeuchi, Ichiro Ohmori, Yoshiaki Kawashima, Masahiro Goto, Masahiko Mikuni, and Walter Vandereycken

Factor analytic study of the Anorectic Behavior Observation Scale (ABOS) in Japan: comparisons with the original Belgian study. Psychiatry Research 111:241-246, 2002

3. Miho Okuyama-Tamura, Masahiko Mikuni, Itaru Kojima.

Modulation of the glucocorticoid receptor function by antidepressant compounds.s.. Neuroscience Letter (in press)

4. Hidenori Nemoto, Hikaru Toda, Takashi Nakajima, Shin Hosokawa, Yuko Konno, Koujiro Yamamoto, Ryuya Horiuchi, Tomio Inoue, Keigo Endo, Itsuro Ida, Masahiko Mikuni, Kunio Matsubara, Fumio Goto.

Regional cerebral blood flow in human antinociception with fluvoxamine. Neuroreport (in press)

##### 2. 学会発表

1. Ida, I, Aihara, M, Majima, T, Yonemura, K, Yuuki, N, Nozaki, Y, Fukuda, M, Matsuda, H, Endo, K, Mikuni, M.

Correlation between metabolic changes  
in right superior temporal gyrus and  
vulnerability to mood disorders. 32<sup>nd</sup>  
Annual Meeting of the Society for  
Neuroscience, Orlando, U.S.A., Nov. 6,  
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

## こころの健康科学研究事業

### 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部門 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・細胞内局在様式を明らかにしようとするものである。本年度は、ヒト死後脳を用いた免疫染色に適する種々の抗ドレブリン抗体の開発を試みた。また、シナプス形成機構におけるドレブリンの役割を初代培養神経細胞を用いて検討した。

#### 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、ヒト死後脳の免疫染色に適するドレブリン抗体を作製する。この抗体を用いて、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) ドレブリンのC末端部分のリン酸化ペプチドを用いて抗体を作製した。また、ドレブリン A 特異的配列に相当するペプチドを合成し、それに対する抗体も作製した。

(免疫組織染色法) 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ピオチンラベル抗血清を用いて30分インキュベートし、その後ペクタステイン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。

ウェスタンブロット

ラット脳より海馬、大脳皮質、小脳、脳幹を取り出し、それぞれ10倍量のSDS サンプルバッファーでホモゲナイズして、サンプルを調整した。サンプルはLaemmli のバッファー系を用いてSDS-PAGE により分離後、イモビロン膜にブロッティングし、各抗体で染色した。発色にはECL キットを用いた。

(倫理面への配慮)

免疫組織染色に供したヒト脳切片は共同研究者の所属する各施設の倫理委員会にプロトコールを提出し、承認を得たものである。検体は個人の非特定化に留意し、プライバシーの保護に万全を期した。動物実験実施に際しては、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

昨年度までの研究で、従来のドレブリンに対する抗体 (M2F6モノクローナル抗体) はヒト脳のパラフィン標本の免疫染色には適さないことがわかった。そこで、昨年度はドレブリンのN末端領域に対する抗体 (抗ドレブリン ADF-Hドメイン抗血清抗 Dadf) を作った。この抗血清を用いてヒト脳パラフィン標本の免疫染色を行ったところ、コントロールの切片でも死後変化と思われるドレブリンの分布の変化が生じてしまった。またさらに、ラット脳を使ったウェスタンブロットの結果から、本抗体は目的とする long-type ドレブリンのほかに、本年度我々が新たに発見した short-type のドレブリンである S-drebrin A (Jin et al. Genomics,

2002) も同時認識してしまうことが明らかとなった。

そこで、ヒト脳のパラフィン切片の免疫染色に適する抗体を作製するために、リン酸化ドレブリンのC末端部位に対する抗体 (抗 PDE)、ドレブリン A 特異的配列に対する抗体 (抗 DA2)、ドレブリン結合蛋白 (X) (未発表) に対する抗体 (抗 X) を作製した。

抗体 (抗 PDE と抗 DA2) は、ラット脳を用いたウェスタンブロット解析ではドレブリン特異的反応をすることが明らかとなった。ヒト脳のドレブリンに対するこれらの抗体の有用性を検討するため、現在、市販の GFAP 蛋白および MAP2 蛋白に対する抗体との免疫二重染色を行っているところである。

また、ドレブリン結合蛋白 (X) に対する抗体 (抗 X) を作製することにも成功したが、抗 X はラット脳の免疫染色においても、ドレブリンと分布を異にすることがわかった。

### D. 考察

抗 Dadf は、従来型のドレブリン (drebrin E と drebrin A) の他に S-drebrin A も認識してしまうので、S-drebrin A の相対的な存在量が少ないといえども、免疫染色には、あまり適さないと考えられる。しかし、この抗体はドレブリンがある程度分解されてもドレブリンを認識できるので、今後 S-drebrin A に特異的な抗体を作製することができれば、画像の差分をとることにより、従来型のドレブリンのヒト脳における分布を明らかにできる可能性がある。また、もし S-drebrin A の脳内局在

が他のドレブリンと同じことが証明されれば、ドレブリンの局在解析に直接使用することができる可能性があり、今後の検討課題である。

ドレブリン局在の死後脳における変化を防ぐ方法として、アクチンへ結合しているドレブリンだけを認識する抗体を作製することが考えられる。アクチンへの結合はリン酸化によって制御されている可能性があるため、本年度はリン酸化ドレブリンに対する抗体（抗 PDE）を作製した。抗 PDE は非リン酸化ドレブリンも認識している可能性があるため、今後エピソードセレクションなどの方法により、リン酸化ドレブリンのみに特異的に反応する抗体成分を調整する必要がある。また、アクチンへの結合はドレブリン E よりもドレブリン A の方が強い可能性が最近の研究（未発表）でわかってきたので、ドレブリン A に対する特異抗体の使用はドレブリン局在の死後変化を回避する方法であろう。しかし従来のドレブリン A 特異的抗体（抗 DA）は免疫組織染色には適さないため、本年度新たに、抗 DA2 抗体を作製した。この抗体が実際に免疫組織染色に使用できるかどうかは今後の検討課題である。

抗 X 抗体についてはラット脳の免疫組織染色像が、ドレブリンの分布と異なることから、本研究目的には適さないと考えられた。

## E. 結論

本年度作製したドレブリンの種々の部分に対する抗体はヒト脳のドレブリン局在を解析するのに使用できる可能性がある

ることがわかった。しかし、ドレブリンの結合蛋白に対する抗血清はドレブリンの局在決定には適さないことがわかった。

## F. 健康危険情報

特記事項無し

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. 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* 79:686-692 (2002)
2. L Ferhat, M Esclapez, A Represa, A Fattoum, T Shirao and Y Ben-Ari. “Upregulation of acidic calponin during dendritic spine plasticity following pilocarpine-induced seizures” *Hippocampus* in press

### 2. 学会発表

1. Y. Sekino and T. Shirao “Tonic activity of adenosine A1 receptors regulates the signal flow at the CA2 region in rat hippocampus: Optical recording analysis” The 28<sup>th</sup> NIPS International Symposium “Inhibitory Neural Transmission in the Brain Structure and Function”, Okazaki, Japan, February 26-28, 2002.
2. H. Takahashi, S. Tanaka, Y. Sekino, T. Shirao. “Two distinct developmental

- states of dendritic filopodia based on the cluster formation of actin-binding protein drebrin.” Society for Neuroscience 32th Annual Meeting, 2002.
3. S. Tanaka, Y. Sekino, T. Shirao. “Suppression of drebrin A expression blocks  $\alpha$ -actinin disappearance induced by glutamate in cortical neuronal cultures.” Society for Neuroscience 32th Annual Meeting, 2002.
  4. T. Shirao, Y. Sekino “Inhibition of drebrin-A expression blocked the postsynaptic actin specialization in the dendritic filopodia.” INMED Conference 2002, 2002.
  5. Y. Sekino, T. Shirao “Roles of adenosine A1 receptors in the hippocampal CA2 region on signal propagation from CA3 to CA1.” INMED Conference 2002, 2002.
  6. 田中聡一、関野祐子、白尾智明 「培養大脳皮質神経細胞のドレブリン A 発現阻害はグルタミン酸刺激による樹状突起スパイン  $\alpha$  - アクチニンの局在変化を抑制する」第 25 回日本神経科学大会、東京、2002 年 7 月 7 日～9 日
  7. 山崎博幸、白尾智明 「ドレブリン結合タンパク質 Drap1 の解析」第 25 回日本神経科学大会、東京、2002 年 7 月 7 日～9 日
  8. 小林千穂、山崎博幸、小山洋、白尾智明 「GFP-ドレブリン A トランスジェニックマウスの作製とその解析」第 25 回日本神経科学大会、東京、2002 年 7 月 7 日～9 日
  9. 高橋秀人、田中聡一、関野祐子、白尾智明 「樹状突起フィロポディアからスパインへの発生過程におけるアクチン細胞骨格の再構成」第 25 回日本神経科学大会、東京、2002 年 7 月 7 日～9 日
  10. Tomoaki Shirao. “Changes of actin-drebrin complex in spine formation and synaptic plasticity.” 第 25 回日本神経科学大会、東京、2002 年 7 月 7 日～9 日
  11. Tomoaki Shirao, Satoshi Tanaka, Hiroyuki Yamazaki, Yuko Sekino “Role of drebrin in signal transmission within the dendritic spine.” 第 45 回日本神経化学学会大会、札幌、2002 年 7 月 17 日～19 日
  12. Hiroyuki Yamazaki, Hideto Takahashi, Eiji Hirose, Nozomu Mori, Tomoaki Shirao “Identification and characterization of drebrin binding protein, Drap1.” 第 45 回日本神経化学学会大会、札幌、2002 年 7 月 17 日～19 日
  13. 小林千穂、山崎博幸、小山洋、白尾智明 「トランスジェニックマウス脳における GFP-Drebrin A の前脳特異的発現」第 49 回北関東医学会総会、前橋、2002 年 9 月 26 日
  14. 山崎博幸、白尾智明 「ドレブリン結合タンパク Drap1 の核局在配列の同定」第 49 回北関東医学会総会、前橋、2002 年 9 月 26 日
- 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

## こころの健康科学研究事業

### 分担研究報告書

#### 海馬でのニューロステロイド合成と作用に関する研究

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専攻 教授

**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を合成することを明らかにした。合成酵素の神経細胞局在、作用部位のエストロジェン受容体の神経細胞局在を、組織染色などで明らかにしつつある。

#### 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）は神経細胞を保護し、抑うつ症治療に効果がある。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。この合成反応にかかわる酵素の解明を目的とする。更に世界的に不明のままである、海馬でのエストロジェン受容体 ER  $\alpha$  の神経細胞での存在と働きを明らかにすることも目的とする。

#### B. 研究方法

1) ステロイド合成を行なうチトクロム P450 系の蛋白質やエストロジェン受容体の抗体組織染色。2) Western Blotting による蛋白質分子量の確認。3) 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。4) 分子生物学手法による mRNA 解析。

#### （倫理面への配慮）

全ての動物実験は東京大学教養学部の定める基準に従って行い、麻酔を行うことによって、動物に苦痛を与えないよう配慮した。

#### 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 P45017 $\alpha$ 、チトクロム P450aromatase、sulfotransferase、工

ストロジェン受容体 ER $\alpha$ 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、これら蛋白は抹消内分泌器官の蛋白と同一の分子量の所に単一バンドが観測された。しかしエストロジェン受容体の分子量は抹消内分泌器官の蛋白とは異なり、この原因を追求している。

3) HPLC 解析を用いて海馬スライスで5時間インキュベーションすることで、<sup>3</sup>H-プレグネノロンから出発して <sup>3</sup>H-DHEA が出来、<sup>3</sup>H-DHEA から出発して <sup>3</sup>H-エストラジオールが出来ることを発見した。また <sup>3</sup>H-アンドロステジオンから <sup>3</sup>H-テストステロンが、<sup>3</sup>H-テストステロンから <sup>3</sup>H-エストラジオールと <sup>3</sup>H-ジヒドロテストステロンが生成することを発見した。一方 <sup>3</sup>H-エストラジオールは海馬スライスではほとんど代謝されず、安定に存在することもわかった。

4) チトクロム P45017 $\alpha$ 、チトクロム P450aromatase、エストロジェン受容体 ER $\alpha$  の mRNA を RT-PCR で解析し、海馬では各々卵巣での存在量の約 1/300、1/300、1/10 程度存在することを確認した。

#### D. 考察

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) →アンドロステジオン→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が、蛋白質、遺伝子、酵素活性の複数の側面から確認された。今後は不明な要素の多いエストロジェン受容体

ER $\alpha$ の実態の解明に重点を置く。

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このエストロジェン受容体 ER $\alpha$ を介して、回復させる効果があるかどうか、電気生理などで調べる。

#### 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。更に作用部位であるエストロジェン受容体 ER $\alpha$ を神経細胞に見出した。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

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Takahashi T, Kimoto T, Tanabe N, Hattori TA, Yasumatsu N, Kawato S 2002 Corticosterone acutely prolonged N-methyl-D-aspartate receptor-mediated Ca<sup>2+</sup> elevation in cultured rat hippocampal neurons. J Neurochem 83(6):1441-1451
2. Takata N, Shibuya K, Okabe M, Nagano T, Kojima H, Kawato S 2002 Pregnenolone sulfate acutely enhances NO production in the rat hippocampus: digital fluorescence study using NO reactive dye. Bioimages 10:1-8
3. Shibuya K, Takata N, Hojo Y, Furukawa A, Yasumatsu N, Kimoto T, Enami T,

Suzuki K, Tanabe N, Ishii H, Mukai H, Takahashi T, Hattori T, Kawato S 2003 Hippocampal cytochrome P450s synthesize brain neurosteroids which are paracrine neuromodulators of synaptic signal transduction. *Biochim Biophys Acta* 1619:301-316

4. Kawato S, Hojo Y, Kimoto T 2002 Histological and metabolism analysis of P450 expression in the brain. *Methods Enzymol* 357:241-249
5. 川戸佳、木本哲也、高橋泰城 2002 “記憶学習機能の動的解析手法と求められる技術：脳ニューロステロイドを中心に” *バイオサイエンスとインダストリー* 60(6), 404 - 407
6. 川戸佳、向井秀夫 2002 “ニューロステロイドによる海馬神経伝達のモジュレーション” *医学のあゆみ* 202(13), 1049 - 1052

## 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