

厚生労働科学研究研究費補助金

こころの健康科学研究事業

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14年度)

主任研究者 車地 曉生

平成15年3月

総括研究報告書（平成14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

車地暁生 1

II. 分担研究報告

ストレス反応の生後発達の分子機構解明と自殺行動との関連の検討

車地暁生 11

研究協力者 伊藤 卓

老年期の自殺行動の分子メカニズム解明と予防・治療法開発への応用に関する研究

西川 徹 14

研究協力者 柏 淳、海野麻未、石井澄和、金子雄二郎

脳内在性D-セリンの作用調節による統合失調症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 19

研究協力者 櫻井新一郎、嶋津 奈、谷口 豪

自殺予防を目指した新規向精神薬開発に関する研究

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 22

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 24

III. 研究成果の刊行に関する一覧 27

IV. 研究成果の刊行物・別刷 33

V. 平成14年度分担研究者氏名一覧 135

I . 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
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 車地 暁生 東京医科歯科大学大学医学部附属病院 講師

研究要旨 わが国の自殺による死亡者は、平成 9 年から平成 10 年にかけて 7000 人以上も増加し、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。まず、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、母子分離ストレスにおいて、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。不安惹起薬投与による脳の活動性変化が生後発達に伴って大きく変化する大脳新皮質で、不安惹起物質投与により発達年齢依存的にその発現量が増加する 10 種類の遺伝子群があることが初めて分かった。また、若年成熟期（56 日齢）に比べて老年期（540 日齢）の方が、不安惹起物質投与によって異常反応性が增大する複数の遺伝子群を見出した。生後 7 日に母子分離ストレス（24 時間）を与え、その直後の母親ラットの養育行動と仔ラット（5 週齢）の不安行動とが関連していたことから、ストレス負荷後の養育環境によって、その後若年期のストレス反応が変化することが分かった。さらに、自殺率が最も高い精神疾患である気分障害患者のミトコンドリア DNA を持つ培養細胞を作成し、ミトコンドリア内カルシウム動態を調べたところ、双極性障害との関連が報告されている 10398 多型で、ミトコンドリア内カルシウム濃度が異なることがわかった。同様に自殺率が高い精神分裂病の薬物治療において、既存の抗精神病薬では難治な症状に対して改善効果が期待される内在性物質 D-セリンについて、その脳内生合成について調べたところ、今まで考えられていたグリアだけでなく神経細胞も重要な働きをしていることが、初めて明らかになった。

分担研究者

西川 徹

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科
教授

山本直樹

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科
助手

神庭重信

山梨大学医学部 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

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発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ぬ。

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。

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。

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. ストレス反応の生後発達の分子機構解明と自殺行動との関連の検討

生後8日または生後8週齢の雄性マウスに、FG 7142 (20 mg/kg, s.c. or i.p.)を投与し、大脳新皮質から（薬物投与1時間後）total RNAを抽出し、DNA microarray法 (Incyte Genomics社)によって、約8737種類の遺伝子に関して、遺伝子発現量の変化を調べた。また、同様に、8日と8週齢の雄性ラットの大脳新皮質から抽出したtotal RNAを用いて、DNA microarray法 (HITACHI, ラ

ットオリゴチップ)によって、約1100種類の遺伝子に関して遺伝子発現量を調べた。

また、各遺伝子の mRNA 量は、各遺伝子に対する特異的プライマーを用いた real-time PCR (LightCycler™, ロッシュ, ダイアグノスティックス KK) による RT-PCR 法を用いて定量した。

2. 老年期の自殺行動の分子メカニズム解明と予防・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 56 および 540 日令の C57/BL 系雄性マウスを用いた。マウスは $22.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 、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。ストレスサーとしては、不安惹起薬の FG-7142 (N-methyl-beta-carboline-3-carboxamide (GABA_A 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) DNA アレイ

マウス大脳新皮質 (neocortex) から total RNA を抽出 (RNeasy RNA extraction Kit, QIAGEN) した。このうち、0.4 ug を用いて、random hexamer priming による逆転写反応によって cDNA を合成し、8,374 クローンに対する DNA チップ (IncyteGenomics, Inc (Genome Systems Inc.)) を使って、生後 56 日と 540 日の間で薬物応答に差のある遺伝子のスクリーニングを行った。さらに、この結果を定量的 RT-PCR により確認した。

(3) 遺伝子発現の定量的解析

上記のように調整した、マウス大脳新皮質 cDNA を、10 倍量の TE buffer で希釈した (SuperScript 2 Reverse Transcription Kit, Invitrogen)。この cDNA 溶液 5ul を以後の定量的 PCR のテンプレートとして用いた。標的遺伝子の発現量補正のための内因性コン

ロールとしては GAPDH を用いた。標的遺伝子 mRNA および GAPDH mRNA に特異的なプライマーペアにより、LightCycler (Roche) を用いてリアルタイム PCR (LightCycler-FastStart DNA master SYBR Green 1 Kit) を行った。PCR 増幅産物の量は Syber Green の蛍光強度として、各サイクルの伸長反応の終わりの時点で測定した。得られた PCR 増幅曲線から LightCycler Software を用いて、GAPDH および標的遺伝子の mRNA 量の相対値を算出した。標的遺伝子の mRNA 発現量は GAPDH mRNA 量に対する比として補正した後、統計解析を行った。なお、PCR 産物の特異性の検討は、PCR 後の融解曲線解析およびアガロースゲル電気泳動による単一バンドの確認により行った。

3. 脳内在性 D-セリンの作用調節による統合失調症の自殺行動に対する新規治療法開発に関する研究

実験には 7 週齢の Wistar 系雄性ラットをもちいた。神経細胞体を選択的に破壊 (グリア細胞や神経終末は存続) する毒素のひとつであるキノリン酸 (PBS に溶解)、ないし PBS のみを pentobarbital 麻酔下にて 7 週齢ラットの両側内側前頭葉皮質に 240 nmol を局所注入した。神経細胞体の選択的破壊は、最終的に冠状断切片の cresyl violet 染色の顕微鏡観察により確認した。局所注入による炎症性反応がほぼ消退する 1 週間後に各部位における D-セリンおよび他のアミノ酸組織含量を調べた。組織サンプルは除蛋白したのち、抽出サンプルの遊離アミノ酸に対して N-ter-butylloxycarbonyl-L-cysteine (Boc-L-Cys) および o-phthalaldialdehyde (OPA) にて室温 2 分間誘導体化処理をしたのち、HPLC にアプライされ、4-um Nova-Pak C18 カラムにて分離された。

4. 自殺予防を目指した新規向精神薬開発に関する研究、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

Wistar/st と SD の 2 系統のラットに対し、

出生後 7 日目に 24 時間の母子分離を行い、母子分離後の母親の養育行動(Arched-back nursing)を観察した。また、離乳後、5 週齢で plus-maze テストを行ない、母親の養育行動と 5 週齢の不安行動との相関を調べた。

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 17 名および健康被験者 18 名である。被験者より採血し、血小板を分離した。

MtDNA を失われた $\rho 0$ (ローゼロ) 細胞に、ミトコンドリアおよび核へのソーティング配列を挿入した、 Ca^{2+} 依存性蛍光タンパク質、Pericam の発現ベクターを強制発現させた。このトランスジーンを恒常発現している細胞をサブクローニングした。

このハイブリッド細胞(サイブリッド)を、患者血小板と融合させた後、calcium imaging system により、ヒスタミン刺激性細胞内 Ca^{2+} 反応を調べた。

(倫理面への配慮)

被験者には研究内容につき説明の上書面にて同意を得た。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倫理委員会の承認を得た。

6. 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. ストレス反応の生後発達の分子機構解明と自殺行動との関連の検討

今年度の研究で、10 種類の既知の遺伝子が発達依存的に、FG 7142 投与によって、遺伝子発現量が増加することがわかった。これまでの研究報告から、これらの遺伝子には、転写調節、シグナル伝達の調節、細胞周期の調節、および細胞外基質タンパク質の分解と

いった 4 種類の機能を持つものであった。転写調節機能(4 種類)またはシグナル伝達調節機能(4 種類)を持つ遺伝子は、生後 8 週では、40—70% の統計学的に有意な増加がみられたが、生後 8 日では、その遺伝子発現量は全く変化していなかった。細胞周期の調節機能を持つ遺伝子(1 種類)と細胞外基質タンパク質の分解機能をもつ遺伝子(1 種類)は、生後 8 日においても、FG 7142 投与により、20—30% の統計学的に有意な増加が認められたが、生後 8 週でみられた 100—160% の増加に比べると、その変化の程度は大幅に小さかった。

2. 老年期の自殺行動の分子メカニズム解明と予防・治療法開発への応用に関する研究

DNA アレイとリアルタイム PCR を用いた検討は、初年度の c-Fos 発現の検討から、不安惹起薬 FG7142 急性投与への応答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行った。生後 56 日と 540 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ところ、FG7142 投与後に、生後 540 日齢でのみ発現が増加する遺伝子転写産物(anxiogenic-responsive transcript 6~8: axg 6~8)を新たに検出した。また、FG7142 投与後の発現が、幼若期(生後 8 日齢)ではほとんど変化しないが、生後 56 日齢に著明な増加が認められる axg 9~11 は、540 日齢において 56 日齢と同様の増加反応を示した。

3. 脳内在性 D-セリンの作用調節による統合失調症の自殺行動に対する新規治療法開発に関する研究

局所神経細胞体の選択的破壊活性をもつキノリン酸を投与後に注入部位を cresyl violet 染色により顕微鏡観察した。注入 1 週間後には、急性期の非特異的炎症性反応として認められる gliosis はほぼ消退していることが確認された。アストロサイトなどのグリア系細胞も保たれているが、介在性ニューロンや局

所から他の組織部位に投射するニューロンなど、キノリン酸注入局所に細胞体をもつ神経細胞は選択的に消失していることがわかった。この局所を含んだ組織をサンプリングして D-セリンを含んだ各種アミノ酸を定量測定した。内側前頭葉皮質に注入した場合、対照群 (PBS 注入) に比して、GABA の含量が著明に低下していた。この時、D-セリンも対照群の 30% 程度にまで低下することが明らかとなった。一方、L-セリンは約 70% 残っていた。このことから、この D-セリンの著明な低下は D-体に特異的な変化であると考えられる。次に、前頭葉皮質局所の選択的神経細胞体破壊における線条体部分の各種アミノ酸を測定した。その結果、GABA、D-セリンおよび L-セリンのいずれの含量にも有意な変化が認められなかった。従って、上記の前頭葉皮質における変化は細胞破壊局所でのみ特異的に起こっていると考えられる。一方、線条体局所にキノリン酸注入をおこなって、線条体局所で神経細胞体を選択的に破壊してその局所での GABA、D-セリン、L-セリンの組織含量を同様に測定した。線条体組織においては、medium spiny neuron と呼ばれる GABA 作動性ニューロンが 90 ないし 95% を占めると考えられている。本実験では、線条体においても GABA および D-セリンは有意に低下していた。一方、L-セリンは対照群に比して有意な低下があるものの約 70% 残っていた。このとき前頭葉皮質では GABA、D-セリン、L-セリンはいずれも変化を認めなかった。

4. 自殺予防を目指した新規向精神薬開発に関する研究、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

SD 系の母ラットは母子分離後、Arched-back nursing が減少したが Wis/st 系のラットでは母子分離後 Arched-back nursing が逆に増加した。5 週齢の仔ラットに plus maze テストを行ったところ、SD 系のラットでは、従来の報告どおりオープンアームの滞在時間が減少した。Wis/st 系のラットでは SD 系とは

逆にオープンアームの滞在時間が増加し不安感受性が低いことが示唆された。

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

双極性障害との関連が報告されている 5178A/C、10398G/A の 2 つのうち、5178 多型による細胞内カルシウム濃度に有意な差異は認められなかった。一方、10398 多型に関しては、A 型のサイブリッドで、G 型のサイブリッドに比べ、有意にミトコンドリア内カルシウム濃度が高かった。刺激後の濃度も、A 型の方が高い傾向が見られた。細胞質カルシウム濃度を反映すると考えられる、核内のカルシウム濃度には、多型間で有意な差は見られなかった。同じ多型間で、双極性障害患者と対照群の間には有意なカルシウム濃度の違いは見られなかった。

D. 考察

1. ストレス反応の生後発達の分子機構解明と自殺行動との関連の検討

前年度の研究で、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 遺伝子産物の免疫活性が、大脳新皮質において、成熟期では著明に増加したが、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。C-fos 遺伝子は前初期遺伝子のひとつである c-Jun 遺伝子産物と activator protein 1 とよばれる転写因子を形成し、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る。従って、先行研究の結果は、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り遺伝子発現調節が大きく変化することを示唆している。そして、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、少なくとも 10 種類の遺伝子が、成熟期において、その発現量が顕著に増加しており、そ

のうち8種類の遺伝子は、幼若期では全く変化しないこと、あとの2種類は有意に変化するものの、その程度は極めて小さいことがわかった。従って、こういった10種類の遺伝子は、不安惹起物質投与により、発達依存的な変化を示しており、生後発達過程で形成される抗ストレス応答システムに関与している可能性が示唆された。今後の研究では、この10種類の遺伝子について、薬物投与後の時間経過やその他の脳部位での変化、さらにその他の不安惹起物質投与による影響についても、詳細に調べる必要がある。

2. 老年期の自殺行動の分子メカニズム解明と予防・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、自殺は児童期以降から年齢とほぼ比例して増加し、中高年で非常に高い自殺率が見られることがわかる。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が変動すると推測される。したがって、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ことが期待される。

本研究では、発達に伴ってストレスへの応答が著しく変化する大脳新皮質において、老年期になるとストレス負荷時に著しい発現増加を示すようになる遺伝子 axg 6~8 を検出した。この結果は、老年期における脳のストレス応答の分子機構が変化することを支持している。axg 9~11 も、年齢に依存してFG7142への反応が変化するが、著明な増加が生ずる

のは axg 6~8 よりも早く 56 日齢からであった。したがって、幼若期、早期成熟期、老年期などの各年齢期には、それぞれ異なる分子カスケードがストレスによって作動しており、このような違いが、ストレス脆弱性や自殺行動誘発の年齢差の生物学的基盤になっている可能性がある。

現在さらに、axg 6~8 およびコード蛋白の老年期のストレス性精神障害や自殺行動予防薬開発の標的分子としての意義を明らかにするため、これらの局在、機能、他のストレスの影響および発現変化をもたらす因子等を解析中である。

3. 脳内在性 D-セリンの作用調節による統合失調症の自殺行動に対する新規治療法開発に関する研究

選択的神経細胞体破壊後の D-セリンの解析結果から、D-セリン含量の変化は、他部位から投射を受けた神経終末ではなく、局所に存在する神経細胞体の破壊を反映していると考えられる。すでに、われわれを含む複数の研究グループの結果からアストロサイトを主としたグリア細胞に D-セリンが取り込まれ、細胞内に含まれていることが示されており、従って、D-セリンの生合成や代謝にはグリア細胞が関与している。しかし、今年度の結果から、グリアのみでなくむしろ神経細胞のくに細胞体が D-セリン合成に重要であることがはじめて明らかとなった。おそらく、神経細胞体とグリア細胞が相互に機能することで、D-セリンの生合成や代謝を調節していると推測される

4. 自殺予防を目指した新規向精神薬開発に関する研究、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

母子分離ストレスの影響は、Wis/st 系のラットでは、SD 系のラットの場合とは逆の結果となった。これは母親の養育行動の違いによる可能性が高い。今回の研究により、劣悪な養育環境に一時的にさらされていても、親の養育行動が、そのストレスの影響を緩和し

たり、むしろストレス脆弱性を生み出す可能性が示唆された。今後は、こういった現象に関与する脳内遺伝子を同定してゆく必要がある。

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

双極性障害との関連が報告された2つの多型のうち、10398多型について、ミトコンドリア内 Ca^{2+} 濃度の変化という、機能的な差異が見られた。リンパ球で見られた CCCP 刺激性カルシウム反応の mtDNA 多型による違いと合わせて、正常範囲の mtDNA 多型がミトコンドリア内カルシウム濃度に影響を与えることが確認された。双極性障害でカルシウム代謝の変化が報告されていることから、mtDNA 多型が双極性障害と関連する分子機構は、カルシウム代謝に影響を与えることである可能性が示唆された。

今後は、各多型を有するサイブリッドで、既存の気分安定薬がミトコンドリア内カルシウム濃度に与える影響を調べ、どのような薬が新規気分安定薬候補になりうるかを検討した後、ミトコンドリア内に Pericam を恒常発現した細胞を用い、ファンクショナルドラッグスクリーニングシステムにより、新規薬剤候補化合物をスクリーニングする予定である。

E. 結論

1. 今年度の研究によって、脳内の抗ストレス対応システムに、10種類の既知の遺伝子が関与することが示唆された。今後の研究において、これらの遺伝子群が、抗ストレス応答システムの中で果たしている役割を明らかにしてゆく必要がある。

2. マウス大脳新皮質から、強い不安を惹起するストレスラーである $GABA_A$ 受容体逆アゴニスト、FG7412 に対して、老年期に、幼若期や早期成熟期とは異なり、著明な発現増加を示す遺伝子 *axg 6~8* を検出した。これは、老年期のストレス応答が他の年齢期と異なる分子カスケードを通して生じており、ス

トレスが精神障害や自殺行動を誘発しやすい現象と関連する可能性が示唆された。

3. D-セリン脳内合成・代謝系に着目し、それにかかわる神経ネットワークをあきらかにすることを試みた。ラット大脳新皮質および線条体においてニューロンの細胞体を *in vivo* で選択的に破壊し、局所における D-セリンおよび各種神経伝達物質の濃度の変化を調べた。その結果、D-セリン生合成には大脳皮質および線条体それぞれにおいて局所ニューロンが重要な役割を担っていることがあきらかとなり、ニューロン-グリア細胞間の相互作用が推定された。この細胞ネットワークシステムは、統合失調症の自殺行動にたいする予防効果が期待できる新規治療薬をスクリーニング上で重要な手がかりとなると考えられる。

4. 母ラットの養育行動の変化がストレス脆弱性を生み出す可能性が示唆された今後、Arched-back nursing の多い群と少ない群の遺伝子発現の差異を調べることで創薬につながるタンパク同定を行う。

5. 双極性障害と関連する mtDNA は、ミトコンドリア内 Ca^{2+} 動態に変化を与えることがわかった。このカルシウム濃度を低下させる薬物が、気分安定薬となる可能性がある。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

論文発表

(1) 原著

1. Macara IG, Baldarelli R, Field CM, Glotzer M, Hayashi Y, Hsu S-H, Kennedy MB, Kinoshita M, Longtine M, Low C, Maltais LJ, McKenzie L, Mitchison T, Nishikawa T, Noda M, Petty EM, Peifer M, Pringle JR, Robinson PJ, Roth D, Russell SEH, Stuhlmann H, Tanaka M, Tanaka T, Trimble WS, Ware J, Zeleznik-Le NJ, and Zieger B: Mammalian septins nomenclature. Mol

- Biol Cell 13: 4111-4113, 2002.
2. Kakeyama M, Umino A, Nishikawa T, Yamanouchi K: Decrease of serotonin and metabolite in the forebrain and facilitation of lordosis by dorsal raphe nucleus lesions in male rats. *Endocrine Journal*, 49: 573-579, 2002.
 3. Higuchi S, Usui A, Murasaki M, Matsushita S, Nishioka N, Yoshino A, Matsui T, Muraoka H, Ishizuka Y, Kanba S, Sakurai T: Plasma orexin-A is lower in patients with narcolepsy. *Neurosci Lett* 318: 61-64, 2002.
 4. Kawashima K, Yamakawa K, Takahashi W, Takizawa S, Yin P, Sugiyama N, Kanba S, Arita J: The estrogen-occupied estrogen receptor is functions as a negative regulator to inhibit cell proliferation induced by insulin/IGF-1: a cell context-specific antimitogenic action of estradiol on rat lactotrophs in culture. *Endocrinology* 143: 2750-2758, 2002.
 5. Ono Y, Ando J, Onoda N, Yoshimura K, Momose T, Hirano M, Kanba S: Dimensions of temperament as vulnerability factors in depression. *Mol Psychiatry* 7: 948-953, 2002.
 6. Suzuki E, Nakaki T, Shintani F, Kanba S, Miyaoka H: Antipsychotic, antidepressant, anxiolytic, and anticonvulsant drugs induce type II nitric oxide synthase mRNA in rat brain. *Neurosci Lett* 333: 217-219, 2002.
 7. Horiuchi J, Saigusa T, Sugiyama N, Kanba S, Nishida Y, Sato Y, Hinuma S, Arita J: Effects of prolactin-releasing peptide microinjection into the ventrolateral medulla on arterial pressure and sympathetic activity in rats. *Brain Res* 958: 201-209, 2002.
 8. Oda K, Okubo Y, Ishida R, Murata Y, Ohta K, Matsuda T, Matsushima E, Ichimiya T, Suhara T, Shibuya H and Nishikawa T: Regional cerebral blood flow in depressed patients with white matter magnetic resonance hyperintensity. *Biol Psychiatry* 53:150-156, 2003.
 9. A. Kurumaji, A. Umino, M. Tanami, A. Ito, M. Asakawa, and T. Nishikawa. Distribution of anxiogenic-induced c-fos in the forebrain regions of developing rats. *J Neural Transm*, in press.
 10. Kajii Y, Muraoka S, Hiraoka S, Fujiyama K, Umino A, and Nishikawa T: A developmentally-regulated and psychostimulant-inducible novel rat gene *mrt1* encoding PDZ-PX proteins isolated in the neocortex. *Mol Psychiatry*, in press.
 11. Ogawa M, Shigeto H, Yamamoto T, Oya Y, Wada K, Nishikawa T, and Kawai M: D-Cycloserine for the treatment of ataxia in spinocerebellar degeneration. *J Neurological Sci*, in press.
 12. Mikami T, Naruse N, Furuya Y, Ohkubo H, Ohkubo T, Matsuura M, Moriya H, Nishikawa T, Kojima T: Vulnerability to schizophrenia in methamphetamine psychosis — using exploratory eye movements. *Psychiatry Clinical Neurosci*, in press.
 13. Fujiyama K, Kajii Y, Hiraoka S and Nishikawa T: Differential regulations by stimulants of neocortical expression of *mrt1*, *arc* and *homer1a* mRNA in the rats treated with repeated methamphetamine. *Synapse*, in press.
 14. Inoue A, Arao Y, Omori A, Ichinose S, Nishio K, Yamamoto N, Kinoshita Y and Mita S: Identification of S1 proteins B2, C1 and D1 as AUF1 isoforms and their major role as hnRNP

proteins. *Biochem J*, in press.

(2) 著書

1. 西川 徹, 融 道男: 精神分裂病の生物学—最近の進歩 脳を知る・創る・守る「脳の世紀」推進会議編 クバプロ, 東京, pp.160-183, 2002.
2. 安宅勝弘, 岩間久行, 西川 徹: 精神分裂病. 看護のための最新医学講座 第 12 巻: pp266-284, 中山書店, 東京, 2002.
3. 黒田 安計, 西川 徹, ドパミン・興奮性アミノ酸仮説, 佐藤光源編『精神分裂病の治療—臨床と基礎』(3. 原因と病態モデル 3-3, 精神分裂病の概念) 朝倉書店, 印刷中.

(3) 総説

1. 車地暁生, 神経発達からみた統合失調症, *精神科*, 1: 299-304, 2002.
2. 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.
3. 西川 徹: 分裂病の分子メカニズムを探る. *こころのクリニック* (東京精神神経科診療所協会誌) 2: 76-91, 2002.
4. 車地暁生, 西川 徹: ストレス関連遺伝子. 特集「PTSD の分子生物学」 *分子精神医学* 2: 205-210, 2002.
5. 西川 徹: 薬理学的モデルを用いた分裂病の発症および再燃に関する遺伝子の探索 *精神神経学雑誌* 104: 487-492, 2002.
6. 西川 徹: 精神分裂病(統合失調症)の分子メカニズム. *Pharma Medica* 20: 25-33, 2002.
7. 加藤忠史: 躁うつ病とミトコンドリアの Ca²⁺シグナル制御機構. *医学のあゆみ* 202: 1059-1061, 2002.
8. 西川 徹: 統合失調症—動物モデルからのアプローチ 特集「精神疾患の分子医学」 *Molecular Medicine* 40: 270-278, 2003.
9. 柏 淳, 西川 徹: 統合失調症の病態・治癒機転と神経可塑的变化 特集「分子

薬理学の進歩—新しい仮説の提言」 *分子精神医学* 3: 1-7, 2003.

10. 山本直樹, 西川 徹: コカイン関連精神障害. *日本臨床 別冊「精神医学症候群 III」*, 印刷中.

(4) その他

1. 山本直樹, 土田英人, 海野麻未, 梶井 靖, 岩間久行, 村岡新一郎, 櫻井新一郎, 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. *精神薬療研究年報* 34: 185-191, 2002.
2. 山本直樹, 岩間久行, 海野麻未, 嶋津 奈, 櫻井新一郎, 谷口 豪, 西川 徹: D-セリンの脳内代謝機構の解明と統合失調症新規薬物治療への応用 *精神薬療研究年報* 第 35 集, 印刷中.
3. 柏 淳, 伊藤 卓, 黒田安計, 梶井 靖, 山本直樹, 石井澄和, 海野麻未, 西川 徹: 逆耐性現象に関与する新規遺伝子 *mrt1* と相互作用する分子の検索. *精神薬療研究年報* 第 35 集, 印刷中.

2. 学会発表

(1) 特別講演, シンポジウム

1. 西川 徹, 海野麻未, 梶井 靖, 黒田安計, 柏 淳, 伊藤 卓, 車地暁生: ストレス脆弱性モデルとしての逆耐性現象と遺伝子発現. 「ストレスの脳科学. モデル動物における遺伝子発現」 第 53 回千里神経懇話会, 大阪, 2002 年 7 月.

(2) 国際学会

1. Tsuchida H, Nakamura M, Uchida S, Maehara T, Hirai N, Nakabayashi T, Nishikawa T: Sellp Spindle in Human Prefrontal Cortex: An Electroencephalographic Study. XII WORLD CONGRESS OF PSYCHIATRY. partnership for Mental Health. Yokohama, Japan, August 28, 2002.

2. Kato T: Neurobiological predictors of lithium response, XII World Congress of Psychiatry, Yokohama August 26-28, 2002.
 3. Yamamoto N, Tomita U, Umino A, Tsuchida H, Sakurai S, Shimazu D, Taniguchi G, Nishikawa T: Uptake and release of D-serine in the rat cortical synaptosome. 32nd Society for Neuroscience Annual Meeting. Orland, FL, USA, November 4, 2002.
 4. Tsuchida H, Yamamoto N, Kajii Y, Umino A, Fukui K, Nishikawa T: Cloning of a D-serine-regulated transcript dsr-1 from the rat cerebral cortex. 32nd Society for Neuroscience Annual Meeting. Orland, FL, USA, November 4, 2002.
 5. Yamashita M, Yoshida S, Numachi Y, Fujiyama K, Toda S, Matsuoka H, Kajii Y, Nishikawa T: Methamphetamine altered the expression of EphA5 mRNA in memory-related brain regions. 32nd Society for Neuroscience Annual Meeting. Orland, FL, USA, November 6, 2002.
 6. Y Numachi, Yoshida S, Fujiyama K, Yamashita M, Toda S, Matsuoka H, Kajii Y, Nishikawa T: Methamphetamine increased spinophilin mRNA in medio-dorsal thalamus. 32nd Society for Neuroscience Annual Meeting. Orland, FL, USA, November 6, 2002.
- (3) 国内学会
1. 山本直樹, 土田英人, 海野麻未, 嶋津奈, 櫻井新一郎, 谷口 豪, 西川 徹: Characterization of D-serine-regulated transcripts in rat rat cerebral cortex. 第45回日本神経化学会大会, 札幌 7. 18, 2002.
 2. 加藤忠史: 双極性障害におけるミトコンドリアの Ca^{2+} シグナル制御障害. 第32回日本神経精神薬理学会年会, 2002年10月17-18日, 前橋
- (4) その他
1. 西川 徹, 車地暁生, 伊藤 卓, 海野麻未: 急性ストレス反応およびストレス脆弱性に関与する分子の発達神経科学的研究. 「ストレス性機能障害とその修復過程の分子機構解明および治療法の開発」研究, 平成14年度研究報告会, 東京, 2002年9月.
 2. 伊藤 卓, 柏 淳, 黒田安計, 梶井 靖, 石井澄和, 海野麻未, 櫻井新一郎, 嶋津 奈, 谷口 豪, 山本直樹, 車地暁生, 西川 徹: 精神異常発現薬を用いた統合失調症の分子病態の発達神経科学的研究, 厚生労働省精神・神経疾患研究委託費, 「新しい診断・治療法の開発に向けた精神疾患の分子メカニズム解明に関する研究」, 平成14年度研究報告会, 東京, 2002年12月.
 3. 車地暁生, 山本直樹, 海野麻未, 西川 徹: ストレスへの応答が発達依存的に変化する遺伝子の検索. 科学技術振興調整費「ストレス性脳機能障害とその修復過程の分子機構解明および治療法の開発」平成13年度研究報告会, 東京, 2002年2月.
- Ⅷ. 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
特記すべきことなし

II. 分担研究報告

ストレス反応の生後発達の分子機構解明と自殺行動との関連の検討

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
研究協力者 伊藤 卓

研究要旨 不安やストレスに関与する脳内神経回路とその分子生物学的機構を解明し、抗不安および抗ストレス効果をもつ新規向精神薬の創案を目的とする研究を行った。実験動物（マウスとラット）に、不安惹起物質である FG 7142 を投与し、大脳新皮質における遺伝子発現が生後発達依存的に変化する遺伝子を、cDNA microarray 法を用いて検索した。今年度の研究により、10種類の既知の遺伝子が、不安惹起物質投与により、発達依存的にその遺伝子発現量が増加することが新たにわかった。

A. 研究目的

脳内の抗ストレス応答システムは、幼若期から成熟期の生後発達の過程で形成されると考えられる。この抗ストレス応答システムの失調が、精神疾患の病態や病因に関与している可能性があり、この失調を緩和あるいは回復させる効果をもつ薬物を開発すれば、精神疾患の治療や予防に有効であり、自殺を含めた様々な行動の異常を防止できる。本研究では、不安惹起物質のひとつである FG 7142 を、実験動物に投与し、発達依存的にその遺伝子発現が変化する遺伝子を検出し、その脳内分布や機能、情報伝達系などを調べることにより、抗ストレス応答システムとの関連を明らかにし、抗不安および抗ストレス作用をもつ新規向精神薬の創案を目的とする研究を行った。

B. 研究方法

生後8日または生後8週齢の雄性マウスに、FG 7142 (20 mg/kg, s.c. or i.p.)を投与し、大脳新皮質から（薬物投与1時間後）total RNAを抽出し、cDNA microarray 法 (Incyte Genomics 社) によって、約8737種類の遺伝子に関して、遺伝子発現量の変化を調べた。また、同様に、8日と8週齢の雄性ラットの大脳新皮質から抽出した total RNA を用いて、cDNA microarray 法 (HITACHI, ラットオリゴチップ) によって、約1100種類の遺

伝子に関して遺伝子発現量を調べた。

また、各遺伝子の mRNA 量は、各遺伝子に対する特異的プライマーを用いた real-time PCR (LightCycler™, ロッシュ, ダイアグノスティックス KK) による RT-PCR 法を用いて定量した。

動物実験においては、その倫理的側面においても、十分考慮し、「東京医科歯科大学動物実験の基本指針」に従った。

C. 研究結果

今年度の研究で、10種類の既知の遺伝子が発達依存的に、FG 7142 投与によって、遺伝子発現量が増加することがわかった。これまでの研究報告から、これらの遺伝子には、転写調節、シグナル伝達の調節、細胞周期の調節、および細胞外基質タンパク質の分解といった4種類の機能を持つものであった。転写調節機能（4種類）またはシグナル伝達調節機能（4種類）を持つ遺伝子は、生後8週では、40—700%の統計学的に有意な増加がみられたが、生後8日では、その遺伝子発現量は全く変化していなかった。細胞周期の調節機能を持つ遺伝子（1種類）と細胞外基質タンパク質の分解機能をもつ遺伝子（1種類）は、生後8日においても、FG 7142 投与により、20—30%の統計学的に有意な増加が認められたが、生後8週でみられた

100—160%の増加に比べると、その変化の程度は大幅に小さかった。

D. 考察

前年度の研究で、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 遺伝子産物の免疫活性が、大脳新皮質において、成熟期では著明に増加したが、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。C-fos 遺伝子は前初期遺伝子のひとつである c-Jun 遺伝子産物と activator protein 1 とよばれる転写因子を形成し、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る。従って、先行研究の結果は、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り遺伝子発現調節が大きく変化することを示唆している。そして、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、少なくとも10種類の遺伝子が、成熟期において、その発現量が顕著に増加しており、そのうち8種類の遺伝子は、幼若期では全く変化しないこと、あとの2種類は有意に変化するものの、その程度は極めて小さいことがわかった。従って、こういった10種類の遺伝子は、不安惹起物質投与により、発達依存的な変化を示しており、生後発達過程で形成される抗ストレス応答システムに関与している可能性が示唆された。今後の研究では、この10種類の遺伝子について、薬物投与後の時間経過やその他の脳部位での変化、さらにその他の不安惹起物質投与による影響についても、詳細に調べる必要がある。

E. 結論

今年度の研究によって、脳内の抗ストレス対応システムに、10種類の既知の遺伝子が関与することが示唆された。今後の研究において、これらの遺伝子群が、抗ストレス応答システムの中で果たしている役割を明らかにしてゆく必要がある。

F. 健康危険情報

とくになし。

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) 原著

1. A. Kurumaji, A. Umino, M. Tanami, A. Ito, M. Asakawa, and T. Nishikawa. Distribution of anxiogenic-induced c-fos in the forebrain regions of developing rats. J Neural Transm, in press.

(2) 総説

1. 車地暁生, 西川 徹: ストレス関連遺伝子, 分子精神医学, 2: 205-210, 2002.
2. 車地暁生: 神経発達からみた統合失調症, 精神科 1: 299-304, 2002.

2. 学会発表

(1) 特別講演, シンポジウム

1. 西川 徹, 海野麻未, 梶井 靖, 黒田安計, 柏 淳, 伊藤 卓, 車地暁生: ストレス脆弱性モデルとしての逆耐性現象と遺伝子発現. 「ストレスの脳科学. モデル動物における遺伝子発現」 第 53 回千里神経懇話会, 大阪, 2002年7月.

(2) その他

1. 西川 徹, 車地暁生, 伊藤 卓, 海野麻未: 急性ストレス反応およびストレス脆弱性に関与する分子の発達神経科学的研究. 「ストレス性機能障害とその修復過程の分子機構解明および治療法の開発」研究, 平成 14 年度研究報告会, 東京, 2002年9月.
2. 伊藤 卓, 柏 淳, 黒田安計, 梶井 靖, 石井澄和, 海野麻未, 櫻井新一郎, 嶋津 奈, 谷口 豪, 山本直樹, 車地暁生, 西川 徹: 精神異常発現薬を用いた統合失調症の分子病態の発達神経科学的研究, 厚生労働省精神・神経疾患研究委託費, 「新しい診断・治療法の開発に向けた精神疾患の分子メカニズム解明に関する研究」, 平成 14 年度研究報告会, 東京, 2002年12月.
3. 車地暁生, 山本直樹, 海野麻未, 西川 徹: ストレスへの応答が発達依存的に変化する遺伝子の検索. 科学技術振興調整費「ストレス性脳機能障害とその修復過程の分子機構

解明および治療法の開発」平成 13 年度研究
報告会，東京，2002 年 2 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
特記すべきことなし

老年期の自殺行動の分子メカニズム解明と予防・治療法開発への 応用に関する研究

分担研究者 西川 徹

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科精神行動医学・教授

研究協力者 柏 淳、海野麻未、石井澄和、金子雄二郎

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。特に初老期から老年期にかけて自殺率が高まる分子メカニズムを明らかにするため、1)自殺が発達や加齢に従って直線的に増加する、2)気分障害、統合失調症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、マウスの脳において加齢に伴ってストレス応答が増大する遺伝子を検索した。すなわち、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 GABAA 受容体ベンゾジアゼピン部位逆アゴニスト FG7142 を負荷したマウスの大脳新皮質において、DNA アレイにより、若年成熟期にあたる 56 日齢に比べ老年期初期の 540 日齢の方が、異常応答性が増大する遺伝子群 *anxiogenic-responsive transcript* 3~5 および 6~8 を見出した。これらの所見は、加齢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関連する可能性がある。

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、等の点に着目して、老年期に自殺行動が生じやすくなる分子機構とその予防・治療法開発の標的分子を明らかにすることをめざ

している。そこで、候補分子として、初年度に続き、心理的ストレスと見なすことができる不安惹起薬負荷に対する異常応答性が、加齢とともに強く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 56 および 540 日令の Wistar 系雄性マウスを用いた。ラットは 22.0 ± 0.5°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 s 販のものを用いた。ストレスサーとしては、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 DNA アレイ

マウス大脳新皮質 (neocortex) から total RNA を抽出 (RNeasy RNA extraction Kit, QIAGEN) した。このうち、0.4 ug を用いて、random hexamer priming による逆転写反応によって cDNA を合成し、8,374 クローンに対する DNA チップ (Incyte Genomics, Inc (Genome Systems Inc.)) を使って、生後 56 日と 540 日の間で薬物応答に差のある遺伝子のスクリーニングを行った。さらに、この結果を定量的 RT-PCR により確認した。

3. 遺伝子発現の定量的解析

上記のように調整した、マウス大脳新皮質 cDNA を、10 倍量の TE buffer で希釈した (SuperScript 2 Reverse Transcription Kit, Invitrogen)。この cDNA 溶液 5ul を以後の定量的 PCR のテンプレートとして用いた。標

的遺伝子の発現量補正のための内因性コントロールとしては GAPDH を用いた。標的遺伝子 mRNA および GAPDH mRNA に特異的なプライマーペアにより、LightCycler (Roche) を用いてリアルタイム PCR (LightCycler-FastStart DNA master SYBR Green 1 Kit) を行った。PCR 増幅産物の量は Syber Green の蛍光強度として、各サイクルの伸長反応の終わりの時点で測定した。得られた PCR 増幅曲線から LightCycler Software を用いて、GAPDH および標的遺伝子の mRNA 量の相対値を算出した。標的遺伝子の mRNA 発現量は GAPDH mRNA 量に対する比として補正した後、統計解析を行った。なお、PCR 産物の特異性の検討は、PCR 後の融解曲線解析およびアガロースゲル電気泳動による単一バンドの確認により行った。

C. 研究結果

DNA アレイとリアルタイム PCR を用いた検討は、初年度の c-Fos 発現の検討から、不安惹起薬 FG7142 急性投与への応答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行った。生後 56 日と 540 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ところ、FG7142 投与後に、生後 540 日齢でのみ発現が増加する遺伝子転写産物 1 種 (anxiogenic-responsive transcript 6~8: axg 6~8) を新たに検出した。また、FG7142 投与後の発現が、幼若期 (生後 8 日齢) ではほとんど変化しないが、生後 56 日齢に著明な増加が認められる axg 9~11 は、540 日齢において 56 日齢と同様の増加反応を示した。

D. 考察

自殺に関する統計を見ると、自殺は児童期以降から年齢とほぼ比例して増加し、中高年で非常に高い自殺率が見られることがわかる。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が変動すると推測される。したがって、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ことが期待される。

本研究では、発達に伴ってストレスへの応答が著しく変化する大脳新皮質において、老年期になるとストレス負荷時に著しい発現増加を示すようになる遺伝子 *axg 6~8* を検出した。この結果は、老年期における脳のストレス応答の分子機構が変化することを支持している。*axg 9~11* も、年齢に依存して *FG7142* への反応が変化するが、著明な増加が生ずるのは *axg 6~8* よりも早く 56 日齢からであった。したがって、幼若期、早期成熟期、老年期などの各年齢期には、それぞれ異なる分子カスケードがストレスによって作動しており、このような違いが、ストレス脆弱性や自殺行動誘発の年齢差の生物学的基盤になっている可能性がある。

現在さらに、*axg 6~8* およびコード蛋白の老年期のストレス性精神障害や自殺行動予防薬開発の標的分子としての意義を明らかにするため、これらの局在、機能、他のストレスの影響および発現変化をもたらす因子等を解析中である。

E. 結論

マウス大脳新皮質から、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、老年期に、幼若期や早期成熟期とは異なり、著明な発現増加を示す遺伝子 *axg 6~8* を検出した。これは、

老年期のストレス応答が他の年齢期と異なる分子カスケードを通して生じており、ストレスが精神障害や自殺行動を誘発しやすい現象と関連する可能性が示唆された。

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

(1) 原著

1. Macara IG, Baldarelli R, Field CM, Glotzer M, Hayashi Y, Hsu S-H, Kennedy MB, Kinoshita M, Longtine M, Low C, Maltais LJ, McKenzie L, Mitchison T, Nishikawa T, Noda M, Petty EM, Peifer M, Pringle JR, Robinson PJ, Roth D, Russell SEH, Stuhlmann H, Tanaka M, Tanaka T, Trimble WS, Ware J, Zeleznik-Le NJ, and Zieger B: Mammalian septins nomenclature. *Mol Biol Cell* 13: 4111-4113, 2002.
2. Kakeyama M, Umino A, Nishikawa T, Yamanouchi K: Decrease of serotonin and metabolite in the forebrain and facilitation of lordosis by dorsal raphe nucleus lesions in male rats. *Endocrine Journal*, 49: 573-579, 2002.
3. Oda K, Okubo Y, Ishida R, Murata Y, Ohta K, Matsuda T, Matsushima E, Ichimiya T, Suhara T, Shibuya H and Nishikawa T: Regional cerebral blood flow in depressed patients with white matter magnetic resonance hyperintensity. *Biol Psychiatry* 53:150-156, 2003.
4. Kajii Y, Muraoka S, Hiraoka S, Fujiyama K, Umino A, and Nishikawa T: A developmentally-regulated and psychostimulant-inducible novel rat gene *mrt1* encoding PDZ-PX proteins isolated in the neocortex. *Mol Psychiatry*, in press.
5. Ogawa M, Shigeto H, Yamamoto T, Oya Y,