

20030724

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-003)

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 三國 雅彦

(群馬大学大学院医学系研究科脳神経精神行動学分野)

平成16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」	
	群馬大学大学院医学系研究科脳神経精神行動学分野 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
	群馬大学大学院医学系研究科脳神経精神行動学分野 三國 雅彦	
2.	「感情障害剖検脳の細胞構築学的研究」	11
	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	
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」	14
	東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻 川戸 佳	
4.	「気分障害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」	17
	山口大学医学部高次神経科学講座 渡辺 義文	
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」	20
	山梨大学医学部精神神経医学・臨床倫理学講座 神庭 重信	
6.	「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」	23
	群馬大学大学院医学系研究科高次細胞機能学分野 白尾 智明	
7.	「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」	27
	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	
8.	「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」	29
	昭和大学医学部精神医学教室 山田 光彦	
9.	「神経ステロイドの脳波学的解析」	34
	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	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	43
IV.	資 料	48

## 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

群馬大学大学院医学系研究科脳神経精神行動学分野

教授 三國 雅彦

### 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。

感情障害死後脳の左前頭前野ブロードマン 9 野 (BA9) の第二層における小型神経細胞密度の有意な低下や前部帯状回 (AC) 第二層の小型神経細胞密度の低下傾向という器質的な変化はグリア細胞密度の変化を伴っていないことがわかり、脳画像解析的には状態依存性の機能異常を示す BA9 や AC にはそれぞれの第二層における介在ニューロンの神経発達期の障害が器質的な感情障害発症脆弱性として存在することを示唆している。しかも、その BA9 第二層にのみセロトニン 5-HT-2A 受容体の陽性細胞が有意に増加していることが、5-HT-2A 受容体ペプチドに対する抗体を用いた免疫組織化学によって明らかにされ、感情障害におけるシナプス伝達機能異常という病態生理形成にとって、発症脆弱性を有する BA9 第二層が果たす役割の大きさが明らかとなった。

感情障害における視床下部—下垂体—副腎皮質系の機能異常が注目されてきたが、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こと、この変化がうつ状態の改善とは相関していないことが明らかになり、感情障害非発症の感情障害患者血縁者でも同様の低下が明らかにされて、素因的な指標である可能性が示唆された。

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、ドレブリンは神経発達期の神経細胞体に存在する E 型と成熟脳の樹状突起やシナプスの存在する A 型があり、抗 A+E 抗体と抗 A 抗体を作成することに昨年度成功していたが、本年度はこれらの抗体を用いてラット成体の側脳室周囲で新生し嗅球に移動している神経細胞が E 型ドレブリンを発現していることを免疫組織化学的に証明できた。また、昨年度は成人死後脳の海馬歯状回において、細胞分裂中のみ核内に発現する Ki 67 陽性神経細胞を免疫組織学的に証明したが、本年度は側脳室周囲に新生中の神経細胞が存在することを証明した。したがって、ヒト死後脳における神経新生と移動神経を解析できる態勢がようやく整った。また、A 型ドレブリンが樹状突起やシナプスの神経棘の形態形成に大きな役割を果たしていることが初代神経細胞培養系では明らかにされているので、感情障害の病態形成とその修復機構、抗うつ薬の作用機序を明らかにする研究を推進する態勢も整ってきている。

もう一つの損傷神経を修復する機構として注目されている神経ステロイド合成の各ステップに関与する酵素がラット海馬において免疫組織化学的に明らかにされるとともに、質量分析により各神経ステロイドの同定も行われて、この分野の研究が一気に進展した。海馬神経細胞に保護的に作用するエストロゲンが血中濃度の百倍

以上の濃度で海馬で合成されており、そのエストロゲン受容体の存在も明らかにされた。また、神経ステロイドの作用を客観的に知るマーカーは無いので、獲得技能が睡眠後に向上する睡眠中長期増強を指標として、神経ステロイドの作用を明らかにする臨床的研究も推進されている。

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、変異型ポリメラーゼ $\gamma$ 発現量が高い変異マウスで、欠失ミトコンドリア DNA の存在が確認された。そのマウスは行動科学的分析により不安水準が高いことが明らかにされ、長期の行動リズムの測定により周期的な行動量の変化を示すことが観察された。すなわち、躁うつ病の遺伝的モデルを作成することに成功した。一方、母子分離ストレス負荷後の母ラットの養育行動の差異によって、子ラットの不安関連行動の発現に差が認められ、出生早期のストレスの影響を救済できる可能性を示唆する貴重な研究成果を得た。その分子メカニズムを解明するため、養育行動が誘発される際に発現する候補遺伝子群を DNA チップで明らかにした。

抗うつ作用の新規の作用機序研究が着々と進められ、Differential display 法を用いて、抗うつ療法に共通して発現が変化する複数の DNA 断片を同定し、そのうち、前シナプスの小胞上の存在するタンパク質をコードする遺伝子に注目し、その抗体を培養細胞系に導入したところ、神経伝達物質の開口放出機構や神経突起進展などに影響することが明らかとなり、抗うつ療法が神経伝達物質の開口放出機構や神経突起進展などの神経回路網の再編という可塑的な変化を起こしている可能性が明確にされた。

#### 分担研究者

- 三國 雅彦 (群馬大学大学院医学系研究科脳神経精神行動学分野 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)
- 川戸 佳 (東京大学大学院総合文化研究科広域科学 教授)
- 渡辺 義文 (山口大学医学部高次神経科学講座 教授)
- 神庭 重信 (山梨大学医学部精神神経医学・臨床倫理学講座 教授)
- 白尾 智明 (群馬大学大学院医学系研究科高次神経機能学分野 教授)
- 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)
- 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)

## A. 研究目的

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。

躁うつ病などの感情障害におけるPETやSPECTを用いた脳画像解析では若年者のうつ病でも、神経学的には無症候の脳血管障害が疑われる高齢者うつ病でも同様に前頭葉の糖代謝の低下や局所脳血流の低下が明らかにされているが、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、脳画像所見と死後脳の解析とをつき合わせる研究が甚だ遅れている。それでも、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が、これまでの死後脳研究は自殺既遂者の死後脳を用いたもので、自殺時点での精神症状の有無や既往の精神障害の診断が困難なものがあり、しかも、自殺手段の影響を排除する対照が無いという研究の限界があった。したがって、感情障害の治療中に身体疾患でなくなった方々の死後脳の解析を進めることが重要となっている。

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微小脳梗塞などの微細な器質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。50歳代以降初発のうつ病患者のMRI解析では白質の高信号や微小脳梗塞が

認められることが多く、vascular depressionという概念にまとめられているが、感情障害の発症脆弱性としての検討はほとんどなされていない。

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ための研究を推進することを目的としている。

## 感情障害発症脆弱性とうつ病態に関する脳画像並びに死後脳の解析研究

池田らは感情障害治療中に自然死した方の死後脳における左側BA9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知見を昨年までに得ていたが、この器質的変化はグリア細胞密度には変化がなく、神経発達期の障害が示唆される貴重な所見を得た。左側前部帯状回膝下部(BA24野)の第二層においても小型神経細胞密度の低下傾向が確認され、この器質的変化もグリア細胞密度には変化がなく、神経発達期の障害が示唆されるという。また、海馬領域の錐体細胞層を中心にセロトニン・トランスポーターの免疫反応性が増加していることを明らかにし、セロトニン伝達障害が存在していることも明らかにした。

これまでも感情障害死後脳で前頭葉背外側面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、これらの報告の多くは自殺者死後脳の検索であるが、池田らの自然死した方々の死後脳の検討ではグリア細胞密度に変化が無く、

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神経発達期の障害が存在することになる。

三國らは感情障害の発症脆弱性と病態について臨床的並びに基礎的な検討を引き続き行った。感情障害治療中に自然死した方の死後脳の左側 BA9 野におけるセロトニン-2A (5-HT-2A) 受容体の陽性細胞を解析し、第二層でのみ有意に陽性細胞数や密度が増加していることを明らかにした。高コルチコステロン血症によってラット前頭葉の 5-HT-2A 受容体結合密度やその陽性細胞数が増加すること、未治療うつ病血小板の 5-HT-2A 受容体機能が亢進していることをこれまで明らかにしてきたが、感情障害者の自然死死後脳において 5-HT-2A 受容体機能の亢進を示す所見が見出された。

一方、退行期に初発する感情障害の発症脆弱性を検索するため、がん告知後、精神症状が認められないがん患者の同意と協力を得て、3ヵ月後、6ヵ月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や Hospital Anxiety and Depression Scale (HADS)で15点以上となった症例と、精神症状を起こさなかった症例や HADSで14点以下だった症例について前方視的調査を開始した。まだ、予備的結果であるが、BA9 野の背外側部の一部が精神症状発現前から FDG-PETでのグルコース取り込み機能の有意な低下部位であることが見出された。これらの対象症例は平均69歳であり、MRIで微小脳梗塞などの器質的な異常が検索される必要があるが、BA9 野の背外側部が高齢者感情障害の発症脆弱性の脳部位の一つである可能性が示唆されていることになり、期待のもてる結果である。

渡辺らは視床下部—下垂体—副腎皮質系の機能異常が高率に見出される感情障害の病態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 (GR) 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。感情障害では  $\beta$  isoform の発現比率が健常者に比較して低

下していることが明らかになり、しかも、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。その後の検討で、感情障害非発症の感情障害患者血縁者でも同様の低下が見いだされており、大変興味深い知見である。 $\beta$  isoform の役割は不明であるが、GR  $\beta$  isoform はデキサメサゾンによるアポトーシスを抑制することが示唆されているので、ストレス負荷時のグルココルチコイド濃度上昇による海馬神経細胞の樹状突起萎縮などの異常が生じる機序の分子機構の一部となっている可能性があることになる。

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、ドレブリン A の特異的配列に対する抗体 (抗 DA2) を作成し、ドレブリン A の存在様式を免疫電顕により解析し、シナプスやスパイン部に限局することを証明した。一方、この抗体のほかに、M2F6 モノクローナル抗体、抗 BrdU 抗体や抗 Ki67 抗体なども用いて、ラット側脳室下帯の神経新生とその後の移動中の前駆神経細胞についての免疫組織化学的検索を行った。その結果、これらの標識細胞は細胞分裂後間もない移動中の神経細胞で、ドレブリン E を発現していることが証明された。この系を用いて、神経新生を制御する技術の確立が可能となる目途がたったことになる。

感情障害の病態に関する動物モデル研究

神庭らは Wistar/st 系ラットが母子分離ストレス負荷後に Arched-back nursing 行動を増加させたが、S-D 系ラットでは逆に減少させることを明らかにし、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示唆する貴重な研究成果を得た。その分子メカ

リズムの解明のために、未妊娠の雌性ラットに養育行動が誘発される際に発現する遺伝子群をDNAチップで検索した。養育行動に関連する候補遺伝子を多数見出すことができ、現在、確認実験中である。

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躁うつ病脳内でのエネルギー代謝異常の存在をMRSで証明する一方、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。その結果、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、変異型ポリメラーゼ $\gamma$ 発現量が高い変異マウスで、欠失ミトコンドリアDNAの存在が確認された。そのマウスは行動科学的分析により不安水準が高いことが明らかにされ、長期の行動リズムの測定により周期的な行動量の変化を示すことが観察された。躁うつ病の動物モデルはこれまで報告例が無かったが、ようやく躁うつ病の遺伝的モデルを作成することに成功したということができ、更なる検討が期待される。

抗ストレス、抗うつ作用の新規作用機序

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としても用いられているが、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証明した。HPLCや質量分析測定を用いた解析で、コレステロールからプログネノロン、プログネノ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やテストステロンを合成していることを証明した。併せて、それぞれの段階に関与する酵素やエストラジオール受容体がCA1-CA3やDG領域の神経シナプスに存在することを免疫電子顕微鏡

観察によって証明した。したがって、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。

内山らは神経ステロイドの作用を客観的に知るマーカーが無いので、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として研究を行っている。すなわち、獲得技能が睡眠後に向上する睡眠中長期増強を指標として、神経ステロイドの作用を明らかにする研究を推進している。本年度はこの睡眠中長期増強の指標として視覚弁別課題を開発し、睡眠後半のSWS出現時間と向上量や、ノンREM睡眠中に出現したデルタ帯域のパワー値と向上量との間に有意な正の相関があることを明らかにした。

山田らは抗うつ療法の奏効機序に関わる分子を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、抗うつ療法に共通して発現が変化する複数のDNA断片を同定することができた。そのうち、前シナプスの小胞上の存在するタンパク質をコードする遺伝子に注目し、その特異抗体をPC12細胞に導入して、内在性のその遺伝子の機能を抑制したところ、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、抗うつ療法が神経伝達物質の開口放出機構や神経突起進展などの神経回路網の再編という可塑的な変化を起こしている可能性が示唆されており、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。

# 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

群馬大学大学院医学系研究科脳神経精神行動学分野  
教授 三國 雅彦

研究要旨： 抗うつ薬療法で臨床症状が改善するとともに、脳画像学的解析でも改善する、機能的な異常を示す脳部位のひとつである前頭前野（BA9 野）に微細な器質的異常が存在することが明らかとなったので、BA9 野のセロトニン神経伝達異常の有無を明らかにするため、セロトニン-2A (5-HT-2A) 受容体のオリゴペプチドに対する抗体を作成して、免疫組織学的に検討し、感情障害死後脳の BA9 野第二層における 5-HT-2A 受容体陽性細胞が有意に増加していることを明らかにした。BA9 野第二層が細胞構築的にもセロトニン神経伝達機能的にも異常があり、うつ病の発症脆弱性やうつ病態と深く関連していることになる。また、がん告知後、精神症状が認められないがん患者のうち、3 ヶ月後、6 ヶ月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や Hospital Anxiety and Depression Scale (HADS) で 15 点以上となった症例と、精神症状を起こさず、HADS で 14 点以下だった症例について前方視的に調査すると、左側 BA9 野の背外側部の一部が精神症状発現前から、FDG-PET でのグルコース取り込み機能の有意な低下部位であることが見出された。高齢者うつ病や適応障害の発症においても左側 BA9 野背外側部の機能低下が発症予測因子のひとつであることが明らかになった。

### A. 研究目的

感情障害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。われわれはこれまでに、未治療感情障害の PET を用いた脳画像解析を行い、左側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、治療前に低下を示した右側上側頭回は治療による症状改善後も低下したままであり、素因的な変化部位であるので、発症脆弱性脳部位のひとつであると考えていた。ところが、東京都精神医学総合研究所の池田研二博士ら

との共同研究により、機能的な異常を示す脳部位のひとつである左側ブロードマン (BA) 9 野に微細な器質的異常が存在することが明らかとなった。しかも、その BA9 野第二層における微細な器質的異常は神経発達期の障害を示唆しており、感情障害の発症脆弱性脳部位のひとつであることが明確にされた。この発達期の異常に基づく発症脆弱性を有する BA9 野はうつ病発症とともに、脳画像的に異常が起こるので、うつ病態を形成している脳部位のひとつでもある。そこで、BA9 野のセロトニン神経伝達異常の有無を明らかにするため、セロトニン-2A (5-HT-2A) 受容体のオリゴペプチドに対する抗体を作成して、免疫組織学的に検討した。

一方、退行期に初発する感情障害の症例では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微小脳梗塞

などの微細な器質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。そこで、がん告知後、精神症状が認められないがん患者の同意と協力を得て、3ヵ月後、6ヵ月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や Hospital Anxiety and Depression Scale (HADS)で15点以上となった症例と、精神症状を起こさず HADSで14点以下だった症例について前方視的に調査した。

## 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、躁うつ病を含む感情障害治療中に身体疾患で死亡した6症例と対照として精神疾患罹患歴のない正常対照5症例の左側BA9野について、10%ホルマリン溶液にて固定し、4 $\mu$ m薄切切片を作成した。一次抗体は5-HT-2A受容体の NH<sub>2</sub>-MEILCEDNISLSS-Ile-Prp-Ile-Prp-Asn-Ser-Leu-Met-Gln-Leu-Gly-Pro-Arg-Leu-Tyr-His-Asn-Asp-Phe-Asn-SRDANTSに対する抗体を作成し、通常のごとく染色し、観察に供した。

2003年3月から2004年2月までの一年間に、がん告知後に転移病巣検索のために全身FDG-PET検査を受ける際に、研究協力を依頼し、同意の得られた、103名の患者について、「つらさの寒暖計」「Hospital Anxiety and Depression Scale (HADS)」をつけてもらい、SCIDにて精神症状の評価を行い、半年間の追跡調査を行った。初回のHADS得点が14点以下で、うつ病や適応障害が否定されている患者(HADS平均8点)で、3ヵ月後、6ヵ月後のHADS得点が15点以上に悪化した9症例(HADS平均17点、平均年齢69歳、大うつ病を発症した2症例、適応障害を発症した1症例を含む)と、初回、3ヵ月後、6ヵ月後のHADS得点がいずれも14点以下であった6ヵ月経過症例から無作為に抽出した10症例(HADS平均4点、平均年齢62歳)とで、初回時のPET画像の差異をSPM解析した。

## (倫理面への配慮)

今回、研究に供された剖検脳は東京都精神医学総合研究所の研究倫理委員会での研究承認を得た上で、情報管理者による匿名化操作を経た後、群馬大学医学部附属病院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に供した。

また、群馬大学医学部附属病院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た。

## C. 研究結果

感情障害治療中に自然死した方の死後脳の左側BA9野における5-HT-2A受容体の陽性細胞を解析したが、第一層から第四層にかけて陽性細胞が観察された。第二層での陽性細胞数/mm<sup>2</sup>は感情障害群が112.8 $\pm$ 49.9、正常対照群が54.2 $\pm$ 20.2 ( $p < 0.04$ )並びに密度(陽性細胞数/全細胞数)は感情障害群が23.6 $\pm$ 5.4、正常対照群が14.6 $\pm$ 3.3 ( $p < 0.01$ )、といずれも感情障害群で有意な増加が観察されたが、他の層では有意な変化は観察されなかった。

がん告知後、精神症状が認められないがん患者のうち、3ヵ月後、6ヵ月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や Hospital Anxiety and Depression Scale (HADS)で15点以上となった症例と、精神症状を起こさず HADSで14点以下だった症例について前方視的に調査しているが、左側BA9野の背外側部の一部が精神症状発現前から、FDG-PETでのグルコース取り込み機能の有意な低下部位であることが見出された。

## D. 考察

感情障害治療中に自然死した方の死後脳の左側BA9野における5-HT-2A受容体の陽性細胞を解析し、第二層でのみ有意に陽性細胞数や密度が増加していることを明らかにした。高コルチコステロン血

症によってラット前頭葉の 5-HT-2A 受容体結合密度やその陽性細胞数が増加すること、未治療うつ病血小板の 5-HT-2A 受容体機能が亢進していることをこれまで明らかにしてきたが、感情障害者の死後脳においても 5-HT-2A 受容体陽性細胞が増加していることを示す所見が見出された。5-HT-2A 受容体の選択的阻害剤は 5-HT-2C 受容体にも親和性が高いものが多く、従来のリガンド結合実験ではこの 5-HT-2C 受容体結合を除外できず、感情障害者脳における PET 検査でも一致した成績は得られてはいない。また、自殺者死後脳を用いた解析が大多数で、その時の対照群はうつ病が否定された自殺者脳であるべきなのに、自然死脳が用いられていて、これらの研究での一致した成績は得られていない。本研究でようやく、感情障害者の自然死死後脳において 5-HT-2A 受容体機能が亢進していることを示す知見が見出された。

一方、退行期に初発する感情障害の症例では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、むしろ中年以降のホルモン変調や微小脳梗塞などの微細な器質因などによって感情障害の発症脆弱性を形成している可能性がある。この前方視的な研究で、がん告知後にうつ病や適応障害を発症したり、HADS 得点が増加した症例では BA9 野の背外側部の一部が精神症状発現前から、FDG-PET でのグルコース取り込み機能が有意に低下していたことが見出された意義は大きい。言うまでもなく、まだ、予備的研究の段階ではあるが、これらの対象症例は平均 69 歳であり、MRI で微小脳梗塞などの器質的な異常の有無が検索される必要があるものの、BA9 野の背外側部が高齢者感情障害の発症脆弱性の脳部位の一つであることを示唆している。

#### E. 結論

感情障害では左側 BA9 野第二層が細胞構築的には介在ニューロンの密度の低下という発達期の異常が存在していて発症

脆弱性と関連し、セロトニン神経伝達機能的にも異常が存在していてうつ病態と深く関連している。また、がん罹患後の高齢者うつ病や適応障害の発症においても左側 BA9 野背外側部の機能低下が発症予測因子のひとつであることが明らかになった。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Kameyama M, Fukuda M, Uehara T, Mikuni M.  
Sex and age dependencies of cerebral blood volume changes during cognitive activation: A multichannel near-infrared spectroscopy study. *NeuroImage* ( in press )

Suto T, Fukuda M, Ito M, Uehara T, Mikuni M.  
Multichannel near-infrared spectroscopy in depression and schizophrenia: cognitive brain activity study.  
*Biological Psychiatry* 55: 501-511, 2004

三國雅彦  
うつ病の発症関連因子—発症脆弱性の脳機能・器質因子—  
*Clin Neuroscience* 22: 147-150, 2004.

Okuyama-Tamura M, Mikuni M, Kojima I  
Modulation of the glucocorticoid receptor function by antidepressant compounds.  
*Neuroscience Letter* 342: 206-210, 2003

Nemoto H, Toda H, Nakajima T, Hosokawa S, Konno Y, Yamamoto K, Horiuchi R, Inoue T, Endo K, Ida I, Mikuni M, Matsubara K, Goto F.  
Regional cerebral blood flow in human antinociception with fluvoxamine.  
*Neuroreport* 14: 791-797, 2003

##### 2. 学会発表

三國雅彦  
こころの病の治療薬の現状と未来  
第 26 回日本医学会総会シンポジウム、福

岡、2003.04.

三國雅彦

感情障害の発症脆弱性に関連する脳部位

第 99 回日本精神神経学会総会教育講演、

東京、2003.05.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

出願番号：特願 2003-319502

生体光計測装置を用いた疾患判定装置

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

## 感情障害剖検脳の細胞構築学的研究

東京都精神医学総合研究所

参事研究員 池田 研二

### 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ので、剖検脳でその神経病理学的基盤研究を行った。前頭葉背側面には皮質体積の有意な減少があり、皮質 II 層において小型細胞密度が少ないことがこれまでの検討で明らかとなっているが、帯状回膝下部においても、グリア細胞や神経細胞の密度に変化はなかったが、II 層の小型細胞密度の低下が示された。この結果は感情障害脳における介在ニューロンの機能障害の可能性を示している。平行して行った気分障害ヒト死後脳を用いた脳内のセロトニン神経系ネットワークの組織形態的側面を免疫組織学的に検討した結果、セロトニントランスポーターの発現が高い状態にあるという結果が得られた。

### A. 研究目的

前頭前野において感情障害脳の脆弱性を示唆する所見や、脳画像研究等で機能異常が指摘されている。14 年度の研究で、前頭葉第 9 野の細胞病理学的な検討の結果、II 層の小型細胞の密度が低いことが示された。ヒトの帯状回膝下部は悲嘆の表出や情動の前処理などに関係し、感情障害脳で細胞構築学的異常が報告されているので同様の手法でこの領域を検討した。

本年度は平行して、感情障害の病因を理解するため一助として、ヒト死後脳の海馬領域において、免疫組織学的にセロトニン神経系の神経終末での貯蔵(vesicle)・受容体(receptor)・再取り込み(transporter)に関する組織上での動態を検討した。検討対象は、モノアミン伝達物質のシナプス内の貯蓄輸送に関わる担体タンパク VMAT2(vesicle monoamin transporter2)、後シナプス膜にあるセロトニン 1A レセプター(以下、5HT1a)シナプス間のセロトニン量の調節に関わるセロトニントランスポーター(以下 5HTT)とした。

### 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、躁うつ病 5 例、年齢の適合する正常対照 6 例を選び、左

側前頭前野帯状回膝下部を検索対象領域とし、20 $\mu$ m 厚パラフィン切片に 1%チオニン染色標本を用いて以下の検討を行った。1) 神経細胞とグリア細胞の密度比、小細胞と大細胞(錘体細胞)の密度比を検討する目的で、各症例の II~V 層の各層に出現する神経細胞数(小細胞と錘体細胞数)とグリア数をマイクロメーターで算定し(対物 20 倍下で 0.1mm<sup>2</sup>, 20 グリッド算定)、各層における錘体細胞、小細胞とグリア細胞数を算定し、出現頻度を比較した。

セロトニン動態研究には、感情障害患者 6 例、対象例として精神神経疾患のない患者 4 例の剖検脳の家馬領域を 4%パラホルム溶液にて 48 時間固定し、クリオスタットで 30 $\mu$ 厚の薄切切片を作成した。免疫組織化学検索に一次抗体として、抗 VMAT2 モノクローナル抗体(CHEMICHON 社)、5HT1a レセプターポリクローナル抗体(CHEMICHON 社)、5HTT モノクローナル抗体(CHEMICHON 社)を用いて、通常の如く染色し、観察に供した。

### (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

### 帯状回膝下部の形態計測

1) 帯状回膝下部において、細胞総数に対するグリア細胞の占める割合は感情障害群と対象群の間で有意差は認められなかった。また、II~V層の各層別での比較でもグリア細胞の占める割合に有意差は認められなかった。

2) 小型細胞の総細胞数に対する割合をII~V層の各層で比較した結果、II層において9.85%の小型細胞の減少が見られたが、統計学的な有意差はなかった。

### 海馬でのセロトニン動態

1) VMAT2: 海馬および海馬傍回皮質において念珠状の免疫陽性線維が数多く観察されたが、正常対照脳と気分障害脳との間に形態学および免疫反応性に差異は見いだされなかった。

2) 5HT1a: 気分障害脳において錐体細胞層を中心に陽性顆粒が多くまた免疫反応性も増加しているのが観察された。

3) 5HTT: 正常対照と比較し海馬領域では、錐体細胞層を中心に免疫反応性が増加していた。

## D. 考察

前頭葉を対象としたこれまでの感情障害剖検脳での研究では、グリアの密度の減少、神経細胞の密度の減少やサイズが小さいことが形態学的変化として報告されている。われわれの感情障害剖検脳の検討では前頭前野背側部の皮質幅の減少が認められた。その病理学的基盤を知る目的で第9野のグリア細胞密度、小細胞密度、神経細胞のサイズを検討したところ、II層の小型細胞密度が有意に低いことが確認された。今回の帯状回膝下部の検討でも、グリア細胞密度の減少はなかったが、II層の小型細胞密度の減少傾向が第9野と共通する所見として確認された。このことは介在ニューロンとしての機能障害や、脳の早期の発達障害を示唆している。剖検脳の海馬でのセロトニン動態の免疫組織化学的な検討結果は、感情障害の脳では元もとセロトニントランスポーターの発現が高い状態にある可能性が示された。抗うつ剤のSSRIはこのトラン

スポーターの働きをストップさせシナプス間のセロトニン濃度を上昇させ、さらにあまり刺激をさせたくない5HT2A受容体をブロックして、抗うつ作用を期待するものであるが、今回の結果はSSRIの作用機序と整合性があるものであった。しかし、ヒト死後脳の場合は、疾患の発症から時間が経過してすでに薬物療法も何回か施されている状況にあるので、さらに検討が必要である。

## E. 結論

感情障害剖検脳では第9野とともに帯状回膝下部においてもII層の小型細胞の密度が低いことが示された。セロトニン系については、感情障害の脳ではセロトニントランスポーターの発現が高い状態にある可能性が示唆された。

## F. 健康危険情報

なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

大島健一, 土谷邦秋, 入谷修司, 上野秀樹, 新里和弘, 中村亮介, 新井哲明, 秋山治彦, 池田研二: 多数の tangle を伴った argyrophilic grain dementia の 1 剖検例. 脳神経 55: 133-138, 2003

池田研二: 痴呆を伴う筋萎縮性側索硬化症と前頭側頭型痴呆. 医学のあゆみ, 205: 133-136, 2003

池田研二: 非アルツハイマー型変性痴呆の最近の分類と知見. 老年精神医学雑誌 14: 279-286, 2003

池田研二: 脳の老化・再考. 脳の老化とグリア細胞の変化. 老年精神医学雑誌 14: 977-983, 2003

Arai T, Nonaka T, Hasegawa M, Akiyama H, Yoshida M, Hashizume Y, Tsuchiya K, Oda T, Ikeda K: Neuronal and glial inclusions in frontotemporal dementia with or without

motor neuron disease are immunopositive for p62. *Neurosci Lett* 342:41-44, 2003

Arai T, Ikeda K, Akiyama H, Tsuchiya K, Iritani S, Ishiguro K, Yagishita S, Oda T, Odawara T, Iseki E: Different immunoreactivities of the microtubule-binding region of tau and its molecular basis in brains from patients with Alzheimer's disease, Pick's disease, progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration. *Acta Neuropathol* 105:489-498, 2003

Iritani S, Niizato K, Nawa H, Ikeda K, Emson PC. Immunohistochemical study of brain-derived neurotrophic factor and its receptor, TrkB, in the hippocampal formation of schizophrenic brains. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27: 801-807, 2003

Aoki K, Uchihara T, Tsuchiya K, Nakamura A, Ikeda K, Wakayama Y: Enhanced expression of aquaporin 4 in human brain with infarction. *Acta Neuropathol* 106: 121-124, 2003

Aoki K, Uchihara T, Sanjo N, Nakamura A, Ikeda K, Tsuchiya K, Wakayama Y. Increased expression of neuronal apolipoprotein E in human brain with cerebral infarction. *Stroke* 34: 875-880, 2003

Uchihara T, Ikeda K, Tsuchiya K: Pick body disease and Pick syndrome. *Neuropathology* 23: 318-326, 2003

Mizuno Y, Ikeda K, Tsuchiya K, Ishihara R, Shibayama H: Two distinct subgroups of senile dementia of Alzheimer type: quantitative study of neurofibrillary tangles. *Neuropathology* 23: 282-289, 2003

Tsuchiya K, Takahashi M, Ikeda K: Subacute speech apraxia and consciousness disturbance in a 57-year-old non-alcoholic man. *Neuropathology* 23: 360-363, 2003

Oshima K, Tsuchiya K, Arai T, Akiyama H, Iritani S, Niizato K, Matsushita M, Ikeda K: Atypical late-onset dementia characterized by limbic degeneration with coiled bodies and

argyrophilic threads. *Clin Neuropathol* 22: 296-303, 2003

池田研二: 死後脳からみたうつ病. *Clinical Neuroscience* 22: 166-169, 2004

Arai T, Ikeda K, Akiyama H, Nonaka T, Hasegawa M, Ishiguro K, Iritani S, Tsuchiya K, Iseki E, Yagishita S, Oda T, Mochizuki A: Identification of amino-terminally cleaved tau fragments that distinguish progressive supranuclear palsy from corticobasal degeneration. *Ann Neurol* 55: 72-79, 2004

Akiyama H, Kondo H, Arai T, Ikeda K, Kato M, Iseki E, Schwab C, McGeer PL. Expression of BRI, the normal precursor of the amyloid protein of familial British dementia, in human brain. *Acta Neuropathol* 107: 53-58, 2004

Ikeda K, Ikeda K, Iritani S, Ueno H, Niizato K: Distribution of neuropeptide Y interneurons in the dorsal prefrontal cortex of schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 28: 379-383, 2004

Uchihara T, Nakamura A, Arai T, Ikeda K, Tsuchiya K: Microglial tau undergoes phosphorylation-independent modification after ischemia. *Glia* 45: 180-187, 2004

Ikeda K, Tsuchiya K: Motor neuron disease group accompanied by inclusions of unidentified protein signaled by ubiquitin. *Neuropathology* 24: 117-124, 2004

## 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。

## 海馬でのニューロステロイド合成と作用に関する研究

東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻

教授 川戸 佳

### 研究要旨:

ストレスの標的である海馬で、神経細胞自身が女性ホルモンを合成することを明らかにした。更に女性ホルモン合成酵素及びエストロゲン受容体の局在を抗体染色や免疫電子顕微鏡で解析し、これらが海馬神経シナプスにも存在することを明らかにした。更に電気生理解析でエストロジェンのシナプス伝達に及ぼす急性効果を解析した。

### A. 研究目的

ストレスがかかると海馬の神経活動が抑制され、特に CA3 領域で顕著に見られる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。これまでエストラジオールはメス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。オス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、本研究において我々は、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を合成していることを証明すると同時に、この合成反応を司る酵素の局在と機能様式との連関を解明することを目指す。更に、現在世界的に未だ未解明である海馬におけるエストロゲン受容体  $ER\alpha$  の神経細胞での存在を証明し、その機能を明らかにすることも目的とする。

### B. 研究方法

1) 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。2) 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ゲン受容体に対する免疫電子顕微鏡観察。3) 電気生理学的手法によるエストロジェンの神経伝達調節作用、特に急性作用の解析。

### (倫理面への配慮)

全ての動物実験は東京大学の定める基準に従って行い、適切に管理された飼育

環境の実現や実験に際しての麻酔等によって、動物に無用な苦痛を与えないよう配慮した。

### C. 研究結果

1) 放射性標識ステロイドを基質とした HPLC 解析により、海馬神経細胞における性ホルモン合成経路において難問として残されていた未決定部分、即ち DHEA からその下流のステロイドへの代謝経路を確定した。成獣ラット脳より調製した海馬組織スライスに対し、 $^3H$  で標識された DHEA を代謝基質として加えてインキュベーションの後、ステロイドを抽出・精製して順相及び逆相 HPLC を用いて代謝産物決定を行った。その結果、アンドロステンジオール、アンドロステンジオン、テストステロンが合成されることが確認されたが、アンドロステンジオールはアンドロステンジオンの 20 倍以上合成されていることから、海馬においては DHEA→テストステロンの合成にかかる主経路はアンドロステンジオールを介する経路であることが示された。更に海馬ステロイドの質量分析測定を行い、海馬でエストラジオールが合成されていることを確定することに成功した。

2) 成獣オスラットの海馬スライスに対して、エストラジオール合成酵素であるチトクロム P450 $17\alpha$ 、P450 aromatase に対する特異的抗体を用いた免疫電子顕微鏡観察を行った。その結果、これらの酵素が海馬 CA1-CA3 や DG 領域における、錐体神経細胞や顆粒神経細胞のポストシナプス及びプレシナプスに存在することを



発見した。神経細胞のミクロソーム膜にも存在する。また新規に作成した ER $\alpha$ に特異的な抗体を用いて同様の免疫電子顕微鏡観察を行い、ER $\alpha$ もやはり海馬 CA1-CA3 と DG 領域における神経シナプスに存在することを確認した。ER $\alpha$ は核内にも多く存在した。

3) ラット海馬神経細胞のシナプス伝達の長期抑制 (long-term depression; LTD) に対するエストラジオールの作用を電気生理学的測定によって解析した。その結果、エストラジオールは NMDA の灌流によって誘導される LTD を解消させることを確認した。

#### D. 考察

以上の結果から、成獣ラットの海馬神経細胞ではシナプスにおいて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ており、かつシナプスにおいてER $\alpha$ を介して神経作用を発現している可能性が示された。エストラジオールは急性的にシナプス神経伝達効率に対して顕著な変化をもたらすことが明らかとなった。

本研究で示されたシナプスにおけるニューロステロイド合成部位とその作用部位の共局在は、ニューロステロイドの機能する場が海馬神経内において完結していることを示唆している。

海馬ニューロステロイドの合成機構に関し、DHEAからテストステロンが合成される経路ではアンドロステンジオールを介する経路が主要経路であることを見出したが、これは末梢ステロイド合成器官におけるステロイド合成経路とは異なる脳独自のステロイド合成経路の存在を示している、興味深い。

#### E. 結論

ストレスの主要な標的である海馬において、神経細胞内の他に神経シナプスでも、女性ホルモンを含むニューロステロイドが合成されることを明らかにした。また、神経細胞の核内の他に神経シナプスにも、女性ホルモンの作用を媒介するエストロゲン受容体 ER $\alpha$ が存在している

ことを発見した。これはストレスに対する女性ホルモンによる神経保護を実現し、ストレス性うつ病等に対する新しい治療方法開発の手がかりとなる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Kawato S, Yamada M, Kimoto T: Neurosteroids are 4th generation neuromessengers: cell biophysical analysis of steroid signal transduction. Adv Biophys 37: 1-48, 2003

Ogiue-Ikeda M, Kawato S, Ueno S: The effect of repetitive transcranial magnetic stimulation on long-term potentiation in rat hippocampus depends on stimulus intensity. Brain Res 993: 222-226, 2003

Ogiue-Ikeda M, Kawato S, Ueno S: The Effect of transcranial magnetic stimulation on long-term potentiation in rat hippocampus. IEEE Trans Magn 39: 3390-3392, 2003

Hojo Y, Hattori TA, Enami T, Furukawa A, Suzuki K, Ishii HT, Mukai H, Morrison JH, Janssen WG, Kominami S, Harada N, Kimoto T, Kawato S: Adult male rat hippocampus synthesizes estradiol from pregnenolone by cytochromes P45017 $\alpha$  and P450 aromatase localized in neurons. Proc Natl Acad Sci USA 101: 865-870, 2004

Kawato S: Endocrine disrupters as disrupters of brain function: a neurosteroid view-point. Environ Sci, in press

川戸 佳: “ステロイドの常識が変わる: 第4世代の脳の情報伝達物質ニューロステロイド: 海馬が性に関係なく男性・女性ホルモンを合成する” 生化学 75(12): 1530-1535, 2003

##### 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

## 気分障害におけるグルココルチコイド受容体異常の検討

山口大学医学部高次神経科学講座

教授 渡辺 義文

研究要旨:視床下部-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 $\alpha$ 、 $\beta$  isoformの発現量比を検討したところ、気分障害患者における $\beta$  isoformの発現比率が低下していた。この変化はうつ状態の改善とは相関せず、患者家族群でも同様の低下が見られることから trait-dependent な指標と考えられた。

### A. 研究目的

気分障害の遺伝的素因としてストレス脆弱性が想定されている。ストレス時の生体の反応に重要な役割を果たす視床下部-下垂体-副腎皮質(HPA)系の機能異常が気分障害患者の多くに認められるとの多数の報告がある。HPA系は全体としてネガティブフィードバック系を形成しているが、この系で唯一抑制性に機能するものがグルココルチコイド受容体(GR)であることから、GRが気分障害の病態やストレス脆弱性に深く関わっている可能性が指摘されている。

GRは基本的には転写調節因子であり、リガンドと結合すると細胞質から核内へと移行してさまざまな遺伝子の転写を促進または抑制する。最近、GRの細胞質内での機能も注目されており、転写調節因子としての役割以外に、細胞内シグナル伝達系にも関わっているようである。GRには alternative splicing の違いにより $\alpha$ 、 $\beta$  2種類の isoform が存在する。これまで主に研究されてきたものはGR $\alpha$ である。GR $\beta$ は、リガンド結合や転写調節に重要なカルボキシル側末端を欠如しており、GR $\alpha$ の転写調節機能を阻害することから、GR $\alpha$ に対する生理的アンタゴニストであるとの考えがある。しかし、アンタゴニストとして機能するには細胞内でのGR $\beta$ 存在量が少な過ぎることなどから、GR $\beta$ の機能についてのコンセンサスは得られていない。

これまで気分障害患者でのGR存在量やGR機能を検討した報告はあるが、GR $\beta$ についての検討はこれまで全く行われていない。

本研究では気分障害患者でのGRに関する異常の有無を検討するために、GR $\alpha$ 、GR $\beta$  mRNAの発現量を気分障害患者と健康人との間で比較するとともに、うつ状態の治療経過における変化を検討した。さらに、GR $\beta$ 発現変化が trait marker になるかを検討するため、気分障害患者血縁者での検討も重ねた。また、抗うつ薬によるGR発現変化も培養系を用いて検討した。

### B. 研究方法

健康者30名(54 $\pm$ 2.5歳)、当科入院中の気分障害患者16名(単極性障害10名、双極性障害6名、61.9 $\pm$ 3.0歳)、当科外来通院中の気分障害患者27名(単極性障害14名、双極性障害13名、55.4 $\pm$ 3.1歳、HAM-D2.8 $\pm$ 0.4点)、気分障害患者血縁者17名(48.5 $\pm$ 3.6歳)に対して検討を行った。入院中の気分障害患者については、初診時もしくは入院時、ついで2ヶ月、4ヶ月、6ヶ月後に検討をおこなった。HPA系機能を評価するため、デキサメサゾン-CRH試験も同時に施行した。

採取した血液10mlからQIAamp Blood mini kit (Qiagen)を用いて総RNAを調整した。得られた総RNA0.25ugをもとにcDNAを合成し、cDNAを鋳型としてPCRを行った。センス側プライマーはGR $\alpha$ とGR $\beta$ に共通の2158-2178番ヌクレオチドに設計し、アンチセンス側プライマーはExon9内にあるそれぞれに固有の領域に設計した。PCR後電気泳動して得られたGR $\alpha$ 、GR $\beta$ のバンド(それぞれ477bpと366bp)の強さを画像解析した。

健常人から得たリンパ球を、抗うつ薬なし、クロミプラミン ( $10^{-7}$ M) 付加、デシプラミン ( $10^{-7}$ M) 付加の 3 群に分けて培養し、培養 3 日後の GR $\alpha$ 、GR $\beta$  mRNA の発現量を検討した。

#### (倫理面への配慮)

あらかじめ本研究の目的、方法を文書で説明し、同意の得られた者のみを研究対象者とした。その際、目的の遺伝子以外の検討には使用しないこと、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、同意の署名をもらった。

#### C. 研究結果

GR $\beta$  発現量は、気分障害患者では入院、外来通院中の両群で健常人に比べて有意に低い値を示した。単極性障害群と双極性障害群の間では有意な差は認められず、いずれの群も健常人に比べて有意に低い値を示した。この GR $\beta$  発現量低下はデキサメサゾン-CRH 負荷試験での抑制・非抑制との間に相関を示さなかった。GR $\beta$  発現量低下は抑うつ状態 (HAM-D スコア) との相関を示さず、治療開始後 6 ケ月の経過中に発現量の増加や減少など一定の傾向は認めなかった。

また、GR $\beta$  発現低下が抗うつ薬による作用であるかを検討するため、抗うつ薬の服薬量との相関を調べたが、有意な相関はなく、服薬していない患者でも発現低下が見られた。さらに、健常人より得られたリンパ球を培養して抗うつ薬を付加し GR 発現に変化が生じるか検討したが、明らかな変化は見られず、抗うつ薬による影響は否定的であった。

以上より、気分障害患者では抗うつ薬内服や、抑うつ状態の程度と関係なく GR $\beta$  低下が認められたため、trait marker になるかを検討するため、気分障害の既往がなく、抗うつ薬の内服歴のない気分障害患者血縁者での GR $\beta$  発現量低下を検討したところ、患者群と同程度の低下が認められた。

一方、GR $\alpha$  発現量に関しては、健常者と気分障害患者及び患者血縁者との間に

差は認められなかった。また治療過程における変化もみられなかった。

#### D. 考察

本研究により、GR $\beta$  の発現が気分障害患者では健常人に比べて有意に低いことが示された。GR $\beta$  発現低下は、抑うつ状態の程度や、抗うつ薬内服に関わらず認められた。また、気分障害の既往がなく抗うつ薬服薬歴のない気分障害患者血縁者群でも、患者群と同程度の GR $\beta$  低下が認められた。以上から、GR $\beta$  発現低下は気分障害における trait marker である可能性が示唆される。

気分障害の trait marker としての可能性が示唆された GR $\beta$  発現量低下は、単極性障害、双極性障害いずれにおいても認められたことから、遺伝的には異質と考えられている両者に共通する指標として興味深い。気分障害患者での GR $\beta$  発現量とデキサメサゾン-CRH 負荷試験の抑制・非抑制との相関は認められず、現在のところ HPA 系ネガティブフィードバック機能低下への関与は不明である。

今後の検討課題は、GR $\beta$  低下が気分障害の病態にどのように関与しているのかを明らかにすることである。GR $\alpha$  と GR $\beta$  はその相互作用によってグルココルチコイドの中樞神経系への作用にバランスをとっているものと推測されるが、GR $\beta$  が脳でどのような機能を担っているのかは全く不明である。GR $\beta$  は GR $\alpha$  と heterodimer を形成することによって、グルココルチコイドによる遺伝子発現調節を阻害するとの仮説がヒト脳においても成り立つとすれば、気分障害患者における GR $\beta$  発現低下の結果、グルココルチコイドによる反応が亢進し、遺伝子発現調節に何らかの異常が出現している可能性が考えられる。

臨床的には、喘息やクローン病、潰瘍性大腸炎といった疾患でステロイド抵抗性を示す患者では GR $\beta$  発現量が増加しているとの報告がある。本研究で示されたように、気分障害では上記の疾患とは逆に GR $\beta$  発現が低下していることから、気分障害ではグルココルチコイドへの過感