

池田研二: 感情障害の神経病理. 第 32 回神経精神薬理学会年会. 前橋, 10 月 17 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。

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、エストロジェンはコルチコステロンが引き起こすシナプス伝達抑制を解消する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る。これに対し 17β -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を解明することを目指す。更に、世界的に未だ未解明であった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、エストラジオールがコルチコステロンの抑圧効果を解消することを解析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 解析及び質量分析。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組織染色及び免疫電子顕微鏡観察。3) エストラジオールの神経スパインに対する急性作用の画像解析。4) 電気生理学的手法によるエストロゲンやコルチコステロ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シトクロム P45017 α 、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。また新規に作成した ER α 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 α 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。

3) 成獣ラット海馬で、低濃度エストラジオールは2時間以内で、蛍光色素でラベルした単一神経の樹状突起スパイン数を増加させることを画像解析で確認した。Thin type というスパインが特に増加していた。

4) ラット海馬神経細胞のシナプス伝達の長期増強 (long-term potentiation; LTP) に対するコルチコステロン及び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コルチコステロンが引き起こす LTP の抑圧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 α を介して神経作用を発現していることが示された。

エストラジオールとコルチコステロンは、急性的にシナプス神経伝達効率の顕著な変化をもたらす。コルチコステロンは抑圧的であるが、エストラジオールは増強的であることが明らかとなった。これは、抑うつ症治療にエストラジオールが効果があることを *in vitro* で示したのものとして興味深い。

ま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て、これまでの神経内分泌学と異なる、神経シナプス分泌学的解析が必要である。

E. 結論

ストレスの主要な標的である海馬において、神経細胞のシナプスで女性ホルモン(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を明らかにした。また、シナプスには女性ホルモンの作用を媒介するエストロゲン受容体 ER α も存在している。エストラジオールはこの受容体を介し、神経スパインを短時間で増加させた。更にエストラジオールはコルチコステロンによる LTP の抑圧を解消させることを確認したので、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

G. 研究発表

1. 論文発表

Ogiue-Ikeda M, Kawato S, Ueno S 2005
Acquisition of ischemic tolerance by repetitive transcranial magnetic stimulation in the rat hippocampus.

Brain Res 1037: 7-11

Takata N., Harada T., Rose JA., Kawato S
Spatiotemporal analysis of NO production
upon NMDA- and tetanic stimulation of the
hippocampus.

Hippocampus, in press

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 2004 Adult male rat hippocampus
synthesizes estradiol from pregnenolone by
cytochromes P45017 α and P450 aromatase
localized in neurons.

Proc Natl Acad Sci USA 101:865-870

Kawato S 2004 Endocrine disrupters as
disrupters of brain function: a neurosteroid
view-point. Environ Sci, 11, 1-14

Sato S, Osanai H, Monma T, Harada T, Hirano
A, Saito M, Kawato S 2004

Acute effect of corticosterone on
N-methyl-D-aspartate receptor-mediated Ca²⁺
elevation in mouse hippocampal slices

Biochem. Biophys. Res. Commun.,
321,510-513

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

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

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

Kawato S, Hojo Y, Kimoto T 2002
Histological and metabolism analysis of P450
expression in the brain. Methods Enzymol
357:241-249

Takahashi T, Kimoto T, Tanabe N, Hattori TA,
Yasumatsu N, Kawato S 2002 Corticosterone
acutely prolonged N-methyl-D-aspartate
receptor-mediated Ca²⁺ elevation in cultured
rat hippocampal neurons. J Neurochem
83(6):1441-1451

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

川戸佳 2003 “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

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

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

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

2. 実用新案登録

3. その他

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に関する研究

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ホルモン受容体の α 、 β isoform の発現量比を検討したところ、気分障害患者における α isoform の発現量が低下していた。この変化はうつ状態の改善とは相関せず、双極性障害患者血縁者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

気分障害患者でのグルココルチコイド受容体の発現および機能の異常を検討することが3年にわたる研究の目的であった。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。HPA系は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ある。

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 α 、 β 2種類の isoform が存在する。GR α が発現量も多く主要な isoform であり、生物学的役割が研究されてきている。一方のGR β 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 α の転写調

節機能を阻害することから、GR α に対する生理的アンタゴニストであるとの仮説が示されているが、アンタゴニストとして機能するには細胞内でのGR β 存在量が少な過ぎることなどから、GR β の機能についてのコンセンサスは得られていない。

3年間の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、まずGR α 、GR β mRNA の発現量の検討をどのような方法で行うべきかを検討し、その上で大うつ病性障害患者、双極性障害患者および健常人でのGR mRNA 発現量を測定した。さらに、抑うつ症状が寛解した寛解期の気分障害患者、気分障害患者の第一度血縁者についても検討した。

B. 研究方法

健常者 31名、大うつ病性障害患者(抑うつ状態) 18名、双極性障害患者(抑うつ状態) 13名、大うつ病性障害患者(寛解期) 39名、双極性障害患者(35名)、大うつ病性障害第一度血縁者 17名、双極性障害第一度血縁者 15名に対して検討を行った。診断はDSM-IVに基づいて行い、抑うつ状態の評価尺度としてハミルトンうつ病評価尺度を用いた。抑うつ状態の患者については、治療経過中2ヶ月後、4ヶ月

後、6ヶ月後にも検討をおこなった。血中コルチゾール濃度を測定し、さらに協力の得られた患者には、デキサメサゾン-CRH 負荷試験を行った。

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 RNA を鋳型として cDNA を合成した。cDNA を鋳型として 1) 通常の PCR 法と、2) リアルタイム PCR を用いて検討した。リアルタイム PCR には試薬として QuantiTect SYBR Green PCR kit (Qiagen) を用い、機材は LightCycler (Roche) を用いた。GR α 、GR β 、GAPDH を測定し、GR α 、GR β 発現量は GAPDH で標準化した。

また、抗うつ薬の末梢リンパ球 GR mRNA 発現に与える影響を検討するために、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 α 、GR β 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. 研究成果

1) 通常の PCR 法とリアルタイム PCR 法との比較

GR α についてはリアルタイム PCR 法のほうが、通常の PCR 法にくらべて、感度・再現性ともに明らかに高かった。GR β については発現量が極めて少ないことからリアルタイム PCR 法での測定も細心の注意を必要とした。通常の PCR 法では PCR による

増殖自体が all or none 的であり、結果は全く信頼できなかった。以上より、気分障害患者での検討はリアルタイム PCR 法を用いて行った。

2) 気分障害患者での GR mRNA 発現量の測定

GR α mRNA 発現量は、大うつ病性障害患者 (抑うつ状態)、双極性障害患者 (抑うつ状態)、大うつ病性障害患者 (寛解期) および双極性障害患者 (寛解期) で、健常人に比べて有意に低い値を示した。抗うつ薬を内服していない気分障害患者でも同様の GR α mRNA 発現量低下を認めた。GR β mRNA に関しては、大うつ病性障害患者 (抑うつ状態) および双極性障害患者 (抑うつ状態) で、健常人に比べて発現量の違いは認めなかった。治療経過中、6ヶ月間 2ヶ月ごとに GR α mRNA の発現量を検討したが、大うつ病性障害患者、双極性障害患者ともに一貫して有意な低下を示した。血縁者に関しては、大うつ病性障害患者第一度血縁者では GR α mRNA 発現量に変化を認めなかったが、双極性障害患者第一度血縁者では GR α mRNA 発現量が有意に低下していた。デキサメサゾン-CRH 負荷試験での抑制群、非抑制群で比較したところ、GR α mRNA の発現量に差は見られなかったが、GR β mRNA は抑制群が、非抑制群に比して、有意に発現量が多かった。

3) 抗うつ薬の末梢リンパ球 GR mRNA 発現に与える影響の検討

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)、パロキセチン (10^{-7} M) 付加の 3 群に分けて培養し、培養 3 日後の GR α 、GR β mRNA の発現量を検討した。その結果、デシプラミン (10^{-7} M) 付加群とパロキセチン (10^{-7} M) 付加群では有意に GR α mRNA 発現量の増加を認めた。GR β mRNA 発現量の変化は認めなかった。

D. 考察

3年間に渡る本研究の成果として、GR α mRNA 発現量が気分障害患者では、抑うつ状態か寛解状態かに関わらず、健常人に比べて有意に低いことが示された。したがって、GR α mRNA 発現低下は状態依存的な現象ではないと思われる。双極性障害では、双極性障害患者第一度血縁者でも GR α mRNA 発現低下を認めたことから、trait-dependent な変化であることが示唆される。GR β mRNA 発現量は気分障害患者群で有意な変化を認めなかったものの、デキサメサゾン-CRH 負荷試験での抑制群では、非抑制群に比べて有意に GR β mRNA 発現量が高いことから、GR β は気分障害の発症そのものには関与していないものの、気分障害の内分泌学的側面に何らかの影響を与えている可能性が示された。GR α mRNA 発現量低下は抗うつ薬を内服していない患者でも認められたことから、抗うつ薬による変化ではないと思われる。さらに、抗うつ薬のリンパ球への影響の検討でも、抗うつ薬が GR α mRNA 量を下げることなくむしろ増加させる効果を示している。したがって、気分障害では GR α mRNA が低下傾向にあり、抗うつ薬は GR α mRNA を増加させることで気分障害患者に臨床的な効果を及ぼしている可能性がある。GR α mRNA 発現量低下は、大うつ病性障害患者、双極性障害患者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。GR α mRNA 発現量低下が気分障害の病態にどのように関与しているのかは今後の課題であるが、GR α mRNA 発現量とデキサメサゾン-CRH 負荷試験の抑制・非抑制との相関が認められなかったことから、GR α mRNA 発現低下が HPA 系以外のシステムに影響を及ぼし、個体のストレス脆弱性を高めている可能性が示唆される。

次の課題は1) GR mRNA 量と GR 蛋白量との相関、2) GR 蛋白量と GR 機能との相関を気分障害患者サンプルを用いて検討することである。さらに GR 遺伝子改変動物を用いて GR の発現低下が気分障害の病態やストレス脆弱性にどのように関与するのかを明らかにしていきたい。

E. 結論

大うつ病性障害および双極性障害において GR α mRNA 発現量は健常人に比べ有意に低下していた。GR α mRNA 発現低下はうつ状態や抗うつ薬依存性ではなかった。双極性障害患者第一度血縁者でも GR α mRNA 発現低下を認めることから、双極性障害に関しては trait-dependent な変化であると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

松原敏郎、信本政昭、渡辺義文

うつ病患者における末梢血白血球中グルココルチコイド受容体 β の検討

第25回 日本生物学的精神医学会(2003)
金沢

松原敏郎、信本政昭、出射 綾、船戸弘正、
西田 朗、渡辺 義文

気分障害患者における末梢血白血球中グルココルチコイド受容体 α 、 β の検討

第26回 日本生物学的精神医学会(2004)
東京

船戸弘正、出射 綾、西田 朗、松原敏郎、

渡辺義文

抗うつ薬によるグルココルチコイド受容体
発現への影響

第 26 回 日本生物学的精神医学会 (2004)
東京

船戸弘正、出射 綾、西田 朗、松原敏郎、
渡辺義文

抗うつ薬はグルココルチコイド受容体発現
を増加させる

第 27 回 日本分子生物学会 (2004) 神戸

Hiromsa Funato, Aya Idei, Toshio Matsubara,
Akira Nishida, Yoshifumi Watanabe

Influence of antidepressants on the expression
of glucocorticoid receptor

Society for Neuroscience, 34th Annual meeting
(2004) SanDiego

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

うつ病の脆弱性に関する神経生物学的研究

分担研究者 神庭重信

九州大学大学院医学研究院精神病態医学分野 教授

我々は、うつ病の脆弱性の神経生物学的基盤を2つのアプローチで研究した。(I) 養育行動が仔ラットに与える長期的影響と養育行動の神経基盤では、ストレス脆弱性は養育環境が脳の発達に長期的な弊害をもたらすことによって作られると考えられる。母子分離ストレスが、発達後のストレス脆弱性、不安の強さ、学習能力の低さと結びついていることは行動科学的に明らかにされているが、そのメカニズムは不明のままであった。そこで母子分離ストレス負荷ラットを用いて、ストレス脆弱性と関連する遺伝子、遺伝子転写調節因子、神経新生について検討した。さらに、養育環境はそれを受ける個体の遺伝的バックグラウンドで異なることが予想されるため、環境—遺伝子相関を踏まえた実験を組み、その分子生物学的メカニズムを明らかにした。(II) interferon- α によるうつ病脆弱性モデルの解析では、抗うつ薬の作用が海馬神経新生の促進と関係している可能性が示唆されている。今回我々は、うつ病の脆弱性のモデルとして、うつ病を誘発することで知られるサイトカイン interferon 投与による海馬神経新生への影響を調べた。その結果、hIFN- α 投与により、アストログリアを介した IL-1 β 産生反応が誘発され、BrdU 陽性細胞が減少する。hIFN- α の中枢作用機序の一端が明らかにされた。抗うつ薬の機序からのみ推定されていた、うつ病の病態として、海馬神経新生の抑制が関与している可能性が裏付けられた。

I 養育行動が仔ラットに与える長期的影響と養育行動の神経基盤

1. 研究目的

ストレス脆弱性は養育環境が脳の発達に長期的な弊害をもたらすことによって作られると考えられる。母子分離ストレスが、不安の強さ、学習能力の低さと結びついていることは行動科学的に明らかにされているが、そのメカニズムは不明のままであった。そこで母子分離ストレス負荷ラットを用いて、ストレス脆弱性と関連する遺伝子、遺伝子転写調節因子、神経新生について検討する。次に、明らかになった分子細胞学的メカニズムをレスキューするような物質を探索する。

さらに、養育環境はそれを受ける個体の遺伝的バックグラウンドで異なることが予想されるため、環境—遺伝子相関を踏まえた実験を組み、その分子生物学的メカニズムを明らかにしていく。

2. 研究方法

1) 母子分離ストレス負荷モデル動物の作成:

山梨大学動物実験施設にて出生した仔ラットに対して、生後5~20日の期間に母ラットより6時間分離する処置を10回行う(Matthewsらの反復母子分離の方法, 1996)。生後21日目以降は、対照群の仔ラットと混合して同一ケージ内にて飼育する。母子分離ストレス負荷モデルのface validityを調べ

る目的で、生後 42～56 日目の各種行動を観察する。不安行動の観察には、open field test、高架式十字迷路を行う。記憶学習能力の測定には、contextual fear conditioning を行う。

2) 神経幹細胞の特性の解明：

adult rat の海馬切片を作成し、新生細胞のマーカである BrdU と神経細胞のマーカである NeuN を用いて二重免疫染色することで、培養幹細胞の増殖能、増殖刺激、分化刺激に対する反応性を測定し、コントロール群とストレス群とを比較することによって、養育環境が幹細胞に与える影響を明らかにする。

3) 倫理的配慮

動物実験は山梨大学医学部動物実験倫理委員会の承認をえて行った。

3. 研究結果

1) 出生直後に母子分離 (maternal deprivation) を行ったラット (以下母子分離ラット) をストレス脆弱性モデルとして、出生直後からハンドリングを行ったラット (以下ハンドリングラット) をストレス高耐性モデルとして、成熟後にそれぞれ拘束ストレスを 2 時間、4 時間、6 時間行い、神経新生を BrdU を用いて観察した。ハンドリングラット群で BrdU 陽性細胞数が増加する傾向が見られた。現在、このメカニズムについて解析中である (図 1)。

さらに、転写因子(transcription factor)である CREB、CEBP/β の変化を観察した。扁桃体では pCREB の変化は観察されなかった。CEBP/β の分布は歯状回 (dentate gyrus) および、CA1 であり、錐体細胞層(pyramidal cell layer)については pCREB と全く逆の分布を示した。この結果から、CEBP/β は単純に CREB の下流に存在するわけではないとい

うことが示唆された。現在サイトカイン IL-1β の変化を解析中である。

2) ラットの系統を変えると、母子分離ストレスが成熟後のラット行動に及ぼす影響も変わることが明らかになった。すなわち SD 系ラットでは、母子分離後に、強い不安行動が観察されたが、Wister 系では、逆に弱い不安行動が観察された (図 2)。このことは、ラットの遺伝的バックグラウンドと養育環境とが相互作用することを示唆している。

3) 母ラットの養育行動をビデオで撮影観察したところ、母ラットの養育行動が系統内、系統間で大きく異なり、母子分離ストレスの影響は、養育行動に大きく依存している事がわかった。すなわち、SD 系ラットでは、母子分離後に、養育行動の現象が観察されたが、Wister 系では、逆に養育行動の増加が観察された (図 3)。現在養育行動に関する遺伝子の探索を進行させている。

4) 母ラットの養育行動に関する遺伝子をジーン・チップで検索したところ、視床下部 preoptic area ならびに扁桃体に数種の mRNA の変動を同定した。現在、これらの遺伝子の機能を調べている。

4. 考察

母子分離ストレスは、成熟後の海馬神経新生に長期的な影響を与えることがわかった。ストレスにより神経新生は抑制されるが、養育環境をより好ましい状態に操作することにより、神経新生を増やす方向に海馬神経幹細胞が反応するという特性を獲得する。行動面での観察では、ラットの系統により、母子分離ストレスの影響が異なること、さらに母子分離時の母ラットの養育行動に差がみられたことから、母子分離が母親の養

育行動に与える影響ならびに子の発達後の行動に与える影響は、遺伝的バックグラウンドによって異なることが明らかになった。

5. 結論

母子分離モデルは、今日の社会問題である人の虐待・ネグレクトなどが子の脳と心の発達にどのような影響を与えるのかを明らかにする恰好の動物モデルである。今後さらにこのモデルの研究を進めることにより、精神疾患の脆弱性の神経生物学的基盤を明らかにし、精神疾患の発症予防につなげていく必要がある。

6. 研究危険情報

該当せず

7. 研究発表

1. Kanba, S.:

Neuroscience of Emotional Stress and Biological Psychiatry of Affective Disorders. In Recent Advances in the Research of Affective Disorder in Japan. Edited by Okuma, T., Kanba, S., and Inoue, Y. Elsevier, Amsterdam, pp. 51-62, 2002.

2. Kudo, K., Qiao C-X., Kanba, S., and Arita, J.: A selective increase in phosphorylation of cyclic AMP response element-binding protein in hippocampal CA1 region of male, but not female, rats following contextual fear and passive avoidance conditioning. Brain Research 1024: 233-243, 2004.

3. Qiao, C-X, Den, R., Kudo, K., Yamada, K., Takemoto, K., Wati, H. and Kanba, S.: Ginseng enhances contextual fear conditioning and neurogenesis in rats. Neuroscience Research 51: 31-38, 2005.

2. 学会発表

1. Kanba S., Kudo K: Early environment and susceptibility to PTSD: Influence of early environment on hippocampal functions. International Congress of Biological Psychiatry, Symposium, Sydney, 2004.

8. 知的財産その他

図1 養育環境操作による海馬神経新生にみる拘束ストレス応答の違い

	No Stress	2 hours	4 hours	6 hours
コントロール	17.8±2.3	24±3.7	23.8±4.1	22.49±2.1
母子分離ストレス	22.5±1.2	18.1±3.1	25.5±4.2	28.03±5.9
ハンドリング	16.9±32.1	21.2±2.1	32.1±1.8#	31.2±3.2#

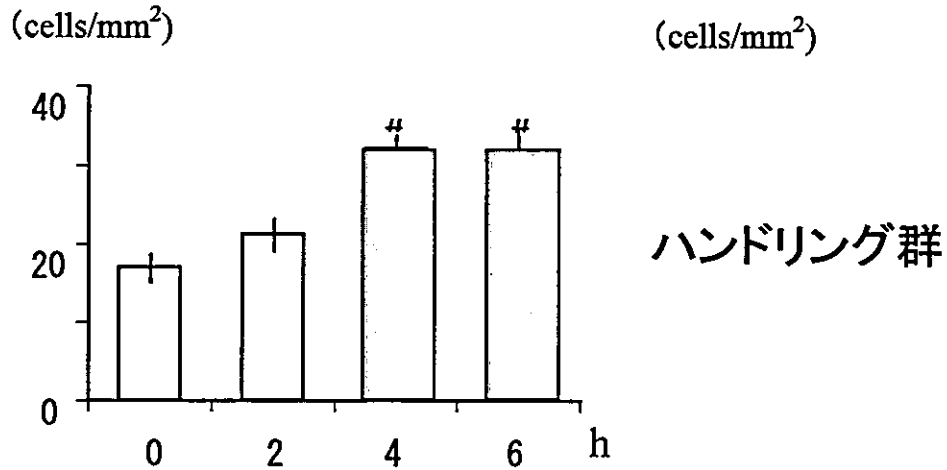


図2 母子分離モデルラットの成熟後の不安行動にみる系統差

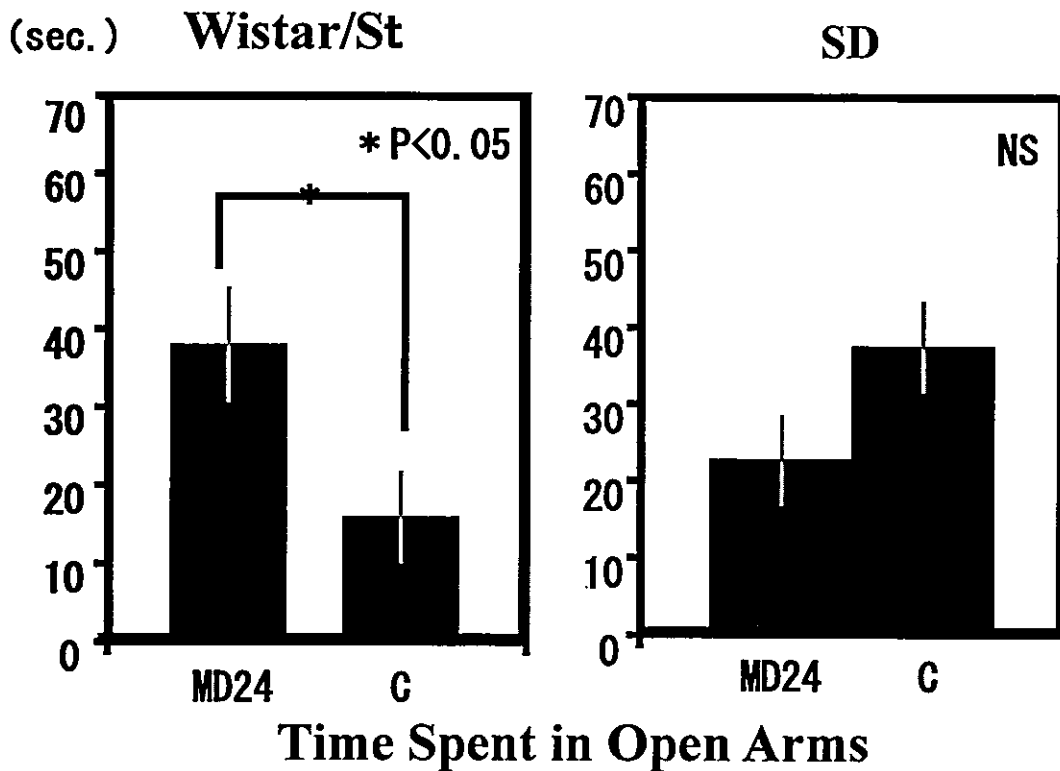
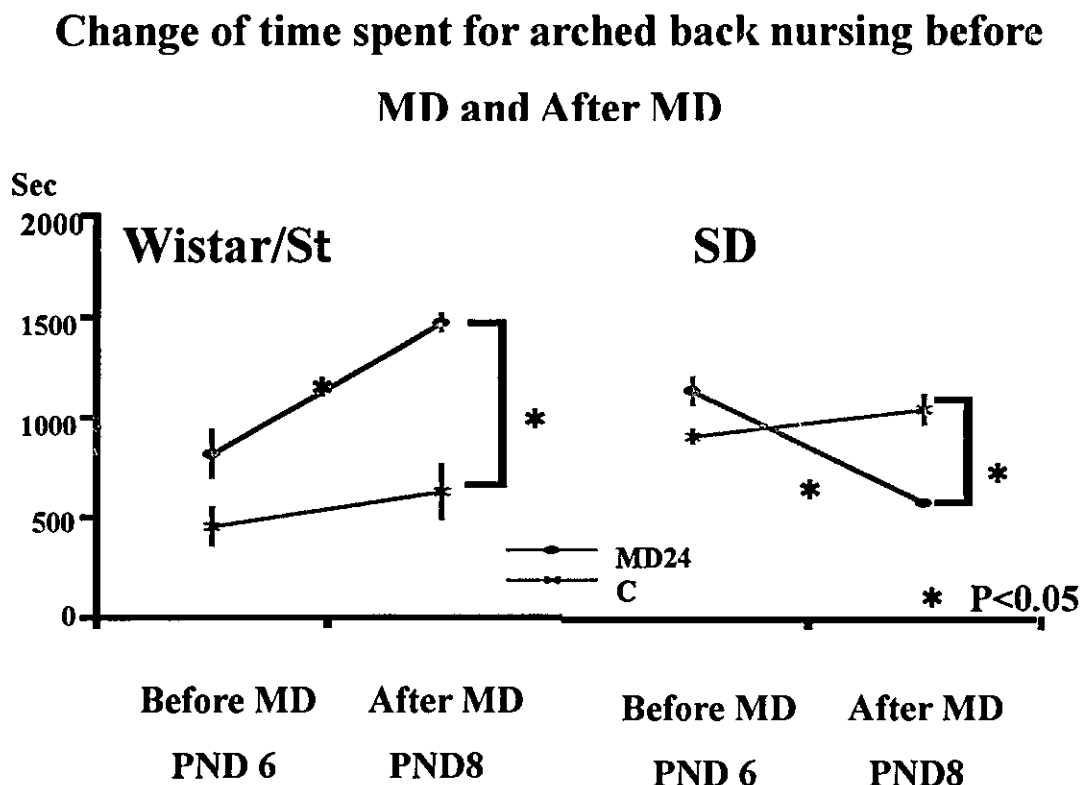


図3 母子分離時の母ラットの養育行動にみる系統差



II interferon- α によるうつ病脆弱性モデルの解析

A. 研究目的

human interferon- α (hIFN- α)は白血球の産生するサイトカインであり、NK細胞活性化やIL-1,2,6, TNF- α 等サイトカインの誘導による免疫賦活作用、抗腫瘍、抗ウイルス作用を持つため、C型慢性肝炎、多発性硬化症などの治療に臨床応用されている。中枢神経系の有害作用、特にIFN誘発性うつ病がhIFN- α 療法中の患者の30~45%に見られるが、抗うつ薬が有効である。

海馬歯状回(DG)では成長後も神経幹細胞の増殖・分化による神経新生が持続し、こ

の現象が記憶・学習などの脳高次機能や各種ストレスに関連して亢進・抑制することが知られており、また抗うつ薬はDGの神経新生を促進する。IFN- α のCNSへの作用機序は未だ不明だが、我々はDGにおける神経新生の抑制との関連を調べた。

昨年までの研究で、hIFN- α 投与により、ラット海馬歯状回におけるBrdU陽性細胞が減少すること、この減少IL-1 β 産生と逆相関していることがわかった。今年度は、hIFN- α がBrdU陽性細胞を減少させる機序の解明に迫った。

B. 研究方法

hIFN- α (5000IU/kg, 20000IU/kg, 50000IU/kg)又はvehicleを7日間連日経静脈投与し、最

終投与 24 時間前に BrdU で DNA 合成している細胞をラベルしたラットを還流固定して脳を取り出し、クリオスタット薄切して free-floating section を作成した。この切片について BrdU 免疫組織染色を行い、海馬歯状回の BrdU 陽性細胞を光学顕微鏡下でカウントした。同時に血中コルチコステロンを測定し、HPA axis との関連を見た。更にこの切片について IL-1 β , TNF- α 免疫組織染色を行い、脳の各部位における陽性領域の面積比を測定してサイトカイン誘導を解析した。IL-1 β はウェスタンで定量化した。IL-1RA の前処置により、hIFN- α の BrdU 陽性細胞数の減少は抑制された。

C. 研究成果

DG の BrdU 陽性細胞数は、hIFN- α 投与群すべてにおいてコントロール群に対し有意に減少しており、また hIFN- α 投与量と正の相関を認めた。hIFN- α 投与量・BrdU 陽性細胞数と血中コルチコステロン値には関連は認められなかった。

IL-1 β 陽性領域については、海馬でのみ低用量(5000IU/kg)IFN- α 群でも有意な増加を認め、TNF- α 陽性領域は、海馬・皮質・視床下部の全部で最高用量群(50000IU/kg)のみ有意な増加を認めた。IL-1RA の前処置で hIFN- α による BrdU 陽性細胞の減少が抑制された。

D. 考察

hIFN- α 投与でヒトでは高率にうつ病を発症し、ラットでは強制水泳試験における無動時間が延長する。この実験で我々は hIFN- α によって DG の BrdU 陽性細胞数が減少することを示した。本年、神経幹細胞の存在が抗うつ薬の作用機序に関連していること

が示され、神経新生とストレス脆弱性の関連が示唆されており、本研究は薬物起因性という限界はあるものの、抑うつ状態の神経病理のひとつのモデルを提唱するものである。

我々の実験結果は、海馬が他の部位と比較して IL-1 産生刺激に対して感受性が高いことを示している。また IL-1 投与による行動異常や学習障害の報告の多いことから、DG における IL-1 産生を介する BrdU 陽性細胞の減少が関与している可能性が高いと結論される。

E. 結論

hIFN- α 投与により、アストログリアを介した IL-1 β 産生反応が誘発され、BrdU 陽性細胞が減少する。hIFN- α の中枢作用機序の一端が明らかにされた。

F. 研究危険情報

該当せず

G. 研究発表

1. 論文発表

無し

2. 学会発表

1. Kaneko N, Kudo K, Mabuchi T, Takemoto K, Wati H, Iguchi H, Fujimaki K and Kanba S: Role of neurogenesis in human interferon-alpha induced animal model of depression. Society for Neuroscience 34th Annual Meeting, San Diego, Oct., 2004

H. 知的財産その他

無し

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

群馬大学大学院医学系研究科高次細胞機能学分野 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である。ドレブリンA特異抗体を開発し、ドレブリンAがスパインの形態形成、NMDA受容体のトラフフィングに関係している可能性を示した。また、ドレブリンEが移動中の神経細胞に特異的に発現していることを明らかにした。

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。ドレブリンにはドレブリンEとドレブリンAの二つの主要なアイソフォームがあるが、ドレブリンAは神経細胞特異的に出た。本研究ではまず、生体脳のドレブリンAを特異的に認識する抗体を開発する。次に、この抗体と従来のドレブリンEとドレブリンAを共通に認識する抗体を用いて、正常ヒト脳およびラット脳におけるドレブリンアイソフォーム別の局在を免疫組織化学により明らかにする。次に、躁うつ病患者および慢性ストレスラットにおけるドレブリン局在を解析し、正常脳と比較することにより、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。また、高感度の検出のために、ビオチン標識二次抗体により処理後、FITC標識ストレプトアビジンあるいはHRP標識アビジンを用いた。HRPの基質としては、DABを用いた。

(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、イモビロン膜にプロットングし、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. 研究成果

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、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、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、ドレブリン A 特異的配列に対する抗体 (DAS2) を作製した。ドレブリンの神経特異的アイソフォームであるドレブリン A を特異的に認識する抗体を作製するために、ドレブリン A 特異的配列である

Phe-Ile-Lys-Ala-Ser-Asp-Ser-Gly-Pro-Ser-Ser-Ser (residues 325-336) を抗原として、ド

レブリン A 特異抗体 DAS2 を作製した。

DAS2 はウェスタンブロットでドレブリン A を特異的に認識した

DAS2 抗体は、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。DAS2 抗体は、ドレブリン A ノックアウトマウスでは、ウェスタンブロットでも免疫染色でも陽性のシグナルを検出できないことが確かめられた。

(側脳室下帯の移動中の細胞「いわゆる Rostrally migrating stream の嗅球顆粒細胞の前駆細胞」) の免疫染色)

側脳室下帯の移動中の細胞 (いわゆる Rostrally migrating stream の嗅球顆粒細胞の前駆細胞) とおもわれる細胞は抗ドレブリンモノクローナル抗体 M2F6 により強く染め出されることが従来の研究から示唆されていた。そこでまず、抗ドレブリンモノクローナル抗体 M2F6 により染め出される細胞の集団が、分裂したばかりの細胞であるかどうかを検討するために、まず BrdU を取り込ませたラット脳を抗 BrdU 抗体で染色した。その結果、抗ドレブリンモノクローナル抗体 M2F6 により染め出される細胞の集団と BrdU を取り込んだ細胞の分布に類似性が確認できた。また、抗 Ki67 抗体による染色で染め出される細胞群とも分布が重なることがわかった。

また、側脳室下帯の移動中の細胞は、M2F6 抗体により濃染するが、ドレブリン A 特異抗体では全く染まらなかった。従って、移動中の細胞はドレブリン E のみを発現していると考えられた。これに反して、ニューロピルの染まり、M2F6 絵もドレブリン A 特異抗体でも同様の点状の染まり方を示した。この点状の染まりは従来の研究成果より樹助突起スパインであると考えられる。今回の染色結果より、スパインには少

なくともドレブリンAが集積していることがわかった。しかしながら、ドレブリンEがドレブリンAと同じようにスパインに集積しているかどうかはわからない。

また、これらの抗体を用いて、鬱病モデル動物として作製した慢性ストレスラットの側脳室下帯の神経細胞移動を解析したところ、明らかな差は観察できなかった。

(成熟ラットの大脳皮質におけるドレブリンAの局在)

DAS2 抗体を用いて、成熟ラット大脳皮質および海馬でのドレブリンAの局在を免疫電顕で観察した。

10個以上の小胞の存在とシナプス後部肥厚の存在を確認できた非対称性シナプスは興奮性のシナプスとして同定した。また、この同定法が正しいことは、GABAおよびNMDA受容体のPEG免疫染色により、確認した。成熟ラット大脳皮質シナプスの23%はシナプス後部肥厚構造を欠失していた。これらのシナプスはいわゆる対称性シナプスであり、抑制性シナプスとして同定できる。この同定法が正しいことは、GABAおよびNMDA受容体のPEG免疫染色法により確認した。ドレブリンAの検出にはSIG免疫染色法およびHRP免疫染色法を用いた。

成熟ラット大脳皮質において同定された190個のシナプス中147個が非対称シナプスであり、そのうち111個のシナプスにドレブリンAの存在を検出できた。また、成熟ラット海馬において同定された179個のシナプス中

150個が非対称性シナプスであり、そのうち102個のシナプスにドレブリンAが検出された。すなわち、大脳皮質、海馬ともに興奮性シナプスの約70%にドレブリンAが検出されたことになる。

対称性シナプスに関しては、大脳皮質で

同定された43個のシナプス中40個が、また海馬で同定された29個のシナプス全てにおいて、ドレブリンAが検出されなかった。ドレブリンが検出された3個の対称性シナプスは興奮性シナプスであることを否定できないので、対称性シナプスに関するこのデータより、抑制性シナプスにはドレブリンAは存在しないと推測される。

新生ラット脳を使って、発生途上の神経細胞におけるドレブリンA局在部位をHRP-DAB標識法で解析したところ、ドレブリンAは樹状突起に特異的に存在し、しかも軸索との接合部に検出された。成熟神経細胞と異なり、ドレブリンAはスパインに関連して検出されることが多いということではなく、未熟な形成過程のシナプスや、まだシナプス前部の特徴が完成されていない部位により多く検出された。このことは、ドレブリンAの出現はシナプス形成時期よりも早い発生過程から起きていることを示している。

生後1週の大脳皮質では、同定された149個のシナプス中58個にドレブリンが検出されたのみである。明らかに非対称性の興奮性シナプスであると同定された93個のシナプスに限ってみても、そのうちドレブリンAが検出されたのは40個にすぎなかった。

D. 考察

(移動中の神経細胞)

躁鬱病において細胞移動の異常があることが推測されている。本研究により、移動中の神経細胞をM2F6抗体で細胞体が濃染し、ドレブリンA特異抗体では染まらないような細胞として同定することにより、BrdUや放射性同位元素の事前投与無しに、かつ移動中の神経細胞を網羅的に解析することを可能とするシステムを開発できた。この免疫染色システムを用いて、慢性スト

レスラットの側脳室下帯の神経細胞移動を解析したところ、明らかな差は観察できなかった。今後は免疫染色像のより定量的な測定方法を開発する必要があることがわかった。また、今後このシステムを用いて、鬱病患者の死後脳を解析することにより、鬱病患者死後脳に観察される大脳皮質の層構造異常が、細胞移動の異常によるものかどうかを解析することが出来ると考えられる。

(スパインにおける Drebrin A の役割) Drebrin A は興奮性シナプスの約 75% に認められた。抑制性シナプスには観察されなかった。興奮性シナプスの発生過程における Drebrin A の出現時期は非常に早く、シナプス前部の発達がまだない軸索・樹状突起結合部にも既に局在が認められた。従って、Drebrin の局在がその後の PSD-95 や NMDA 受容体等の集積を促す可能性が示唆された。

E. 結論

Drebrin A 特異的抗体 DAS 2 と、汎 Drebrin 抗体 M2F6 を組み合わせて用いることにより、事前の処置無しに細胞移動を解析することが可能となったので、鬱病患者の死後脳を用いて、鬱病と神経細胞移動の異常を解析することが可能となった。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

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)

Ferhat, L., Esclapez, M., Represa, A., Fattoum,

A., Shirao, T., and Ben-Ari, Y. "Upregulation of acidic calponin during dendritic spine plasticity following pilocarpine-induced seizures" *Hippocampus* 13:845-858 (2003)

Takahashi, H., Sekino, Y., Tanaka S., Mizui, T., Kishi, S, and Shirao, T., "Drebrin-dependent Actin Clustering in Dendritic Filopodia Governs Synaptic Targeting of Postsynaptic Density-95 and Dendritic Spine Morphogenesis" *J. Neurosci.* 23:6586-6595 (2003)

Tezuka, M., Oda, O., Shirao, T., Inoue, HK., "Microglia/macrophage reactions and cell proliferation during the repair of spinal cord injuries in infant rats" *Neurotrauma Res*, 15: 17-20 (2003)

Kobayashi, R., Sekino, Y., Shirao, T., Tanaka, S., Ogura, T., Inada, K., and Saji, M. "Antisense knockdown of drebrin A, a dendritic spine protein, causes stronger preference, impaired pre-pulse inhibition, and an increased sensitivity to psychostimulant." *Neurosci. Res.* 49:205-217 (2004)

Butkevich, E., Huelsmann, S., Wenzel, D., Shirao, T., Duden, R., Majoul, I., "Drebrin is a novel Connexin-43 binding partner that links gap junctions to the submembrane cytoskeleton." *Curr. Biol.* 14:650-658 (2004)

Hanaoka, R., Ohmori Y., Uyemura, K., Hosoya, T., Hotta, Y., Shirao, T., Okamoto, H. "Zebrafish gcmb is required for pharyngeal cartilage formation" *Mech Dev.* 121:1235-1247 (2004)

Aoki, C., Sekino, Y., Hanamura, K., Fujisawa, S., Mahadomrongkul, V., Ren, Y., and Shirao, T. "Drebrin A is a Postsynaptic Protein that Localizes in vivo to the Submembranous Surface of Dendritic Sites Forming Excitatory Synapses" *J. Comp. Neurol* 483: 383-402 . (2005)

関野祐子、高橋秀人、白尾智明「スパイン
アクチン細胞骨格は興奮生シナプス成熟
を制御する」蛋白質・核酸・酵素 49 :
270-275 (2004)

白尾智明、関野祐子、高橋秀人「蛋白レベ
ルから見た神経シナプスの発達と異常」
日本精神神経薬理学雑誌 24 : 247
- 256 (2004)

2. 学会発表

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 28th NIPS
International Symposium "Inhibitory Neural
Transmission in the Brain Structure and
Function", Okazaki, Japan, February 26-28,
2002.

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.

S. Tanaka, Y. Sekino, T. Shirao. "Suppression of
drebrin A expression blocks α -actinin
disappearance induced by glutamate in
cortical neuronal cultures." Society for
Neuroscience 32th Annual Meeting, 2002.

T. Shirao, Y. Sekino "Inhibition of drebrin-A
expression blocked the postsynaptic actin
specialization in the dendritic filopodia."
INMED Conference 2002, 2002.

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.

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バ

イン α -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

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

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
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

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

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

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

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

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

Sixth IBRO World Congress of Neuroscience,