

- Prague, Czech Republic. July 10-15, 2003. Y. Sekino, T. Shirao and K. Obata. "Adenosine A1 Receptor Activity Regulates Signal Processing in the Hippocampus"
- Sixth IBRO World Congress of Neuroscience, Prague, Czech Republic. July 10-15, 2003. Shirao T, Takahashi H, Sekino Y, and Obata K. "Drebrin Clustering with Actin Filaments is a first Essential Step of Dendritic Spine Morphogenesis."
- International Synaptogenesis meeting, Vienna, Austria Jun 5-7, 2003. Shirao T, Takahashi H, and Sekino Y. "Drebrin Clustering with Actin Filaments is an Essential Step of Dendritic Spine Morphogenesis"
- Society for Neuroscience 33th Annual Meeting, 2003. T. Shirao; H. Takahashi; Y. Sekino; T. Mizui "Cluster formation of drebrin in filopodia is an essential step for dendritic spine morphogenesis."
- Society for Neuroscience 33th Annual Meeting, 2003. Makoto Ito, Kenji Doya, Tomoaki Shirao and Yuko Sekino "Spatial distribution of Fos-positive neurons in the supramammillary nucleus and the hippocampus of rats placed in a novel environment"
- 白尾智明、高橋秀人、関野祐子、田中聡一、水井俊幸「樹状突起スパイン形成初期におけるドレブリン-アクチン複合体の出現」第76回日本薬理学会年会・第80回日本生理学会大会、福岡、2003年3月24日～26日
- 関野祐子、伊藤真、小林千穂、笹川快生、白尾智明「新規環境探索行動における上乳頭体核と海馬の神経活動」第76回日本薬理学会年会・第80回日本生理学会大会、福岡、2003年3月24日～26日
- Yoshio Sasagawa, Chiho Kobayashi, Yoko Sekino, Hirokazu Murakami, Tomoaki Shirao "Generation of transgenic mice expressed GFP-drebrin A in the hippocampus" 第26回日本神経科学学会、名古屋、2003年7月23 - 2003年7月25日
- Mizui Toshiyuki, Takahashi Hideto, Koyama Hiroshi, Shirao Tomoaki "Abnormal shape of dendritic filopodia and spines induced by overexpression of drebrin A in cultured hippocampal neurons" 第26回日本神経科学学会、名古屋、2003年7月23 - 2003年7月25日
- Sekino Y., Tanaka, S., Shirao T. "Drebrin is redistributed to the dendritic shafts with actin filaments by glutamate receptor activation" 第26回日本神経科学学会、名古屋、2003年7月23 - 2003年7月25日
- 小林千穂、伊藤真、小林静香、佐治真理、白尾智明、関野祐子 "Activity of Supramammillary nucleus is involved in the acquisition of the novel information" 第26回日本神経科学学会、名古屋、2003年7月23 - 2003年7月25日
- Hideto Takahashi, and Tomoaki Shirao "Functional roles of actin cytoskeleton in dendritic spine morphogenesis during development." 第26回日本神経科学学会、名古屋、2003年7月23 - 2003年7月25日
- Hiroyuki Yamazaki, Chiho Kobayashi Toshiyuki Mizui and Tomoaki Shirao "Subcellular localization of Drap1, drebrin associated protein 1, in cultured hippocampal neurons" 第26回日本神経科学学会、名古屋、2003年7月23 - 2003年7月25日
- 伊藤真、銅谷賢治、白尾智明、関野祐子「新規環境下ラットの扁桃体神経活動は上乳頭体核により調節される」第13回日本神経回路学会、東京2003年9月8日～9月10日
- Hiroyuki Yamazaki, Toshiyuki Mizui, Chiho Kobayashi, Tomoaki Shirao "Domain

- analysis of Drebrin-associated protein 1, Drap1” 第46回神経化学会大会、新潟、2003年9月24日～26日
- Toshiyuki Mizui, Kenji Hanamura, Hideto Takahashi, Tomoaki Shirao, Yuko Sekino “Time lapse recording of translocation of GFP-drebrin A, an actin-binding protein in dendritic spines, induced by activation of glutamate receptors in hippocampal neurons” (シンポジウム Regulation of synaptic functions) 第46回日本神経化学会大会、新潟、2003年9月24日～26日
- 高橋秀人、関野祐子、水井利幸、白尾智明 「海馬錐体細胞の発生過程での樹状突起フィロポディアからスパインへの変化におけるアクチン細胞骨格の役割」海馬と高次脳機能学会、東京、2003年11月23日～24日
- 白尾智明 「樹状突起スパインの形態形成」 (シンポジウム神経細胞の形態制御の分子機構) 第77回日本薬理学会年会、大阪、2004年3月8日～10日
- 関野祐子、水井俊幸、花村健次、白尾智明 「グルタミン酸により誘発されるドレブリンのスパインから樹状突起幹への移行：GFP標識ドレブリンAのタイムラプスレコーディングによる解析」第77回日本薬理学会年会、大阪、2004年3月8日～10日
- 笹川快生、小林千穂、白尾智明、関野祐子 「ドレブリンA過剰発現マウスの海馬スライスにおける長期増強」第77回日本薬理学会年会、大阪、2004年3月8日～10日
- The 6th biennial meeting of the Asian-Pacific Society, Hong Kong, China. February 2004. Yamazaki H., Shirao, T. “A novel drebrin binding protein, Drap1, is localized in synaptic site, nucleus and non-clathrin-coated vesicle.”
- First ISN special Neurochemistry Conference “Changes in neuronal gene expression and CNS drug responses” May 13-16, 2004, Avignon, France. Shirao, T., Takahashi, H.; Sekino, Y.; Hanamura, K “Expression of Drebrin A Induces Drebrin-dependent Actin Clustering and Synaptic Targeting of Postsynaptic Density-95
- Gordon Research Conferences “Cell Biology Of The Neuron” chaired by Halpain S. and Neher E. June 20-25, 2004 Colby-Sawyer College, New London, NH (Invited)
- Workshop on “Molecular Basis of Synaptic Plasticity “June 27 – June 30, 2004 Center for Neural Science, NYU, New York, NY (Organized and Invited)
- Society for Neuroscience 34th Annual Meeting, 2004. Minisymposium on “Mechanisms of structural plasticity of dendritic spines” chaired by Penzes P., T. Shirao, H. Takahashi, Y. Sekino and T. Mizui. “Activity-dependent regulation of drebrin-actin cluster formation during spine development.” (Invited)
- 14th Neuropharmacology Conference: The Cytoskeleton and Synaptic Function October 20-22, 2004, San Diego, CA, USA. Takahashi, H., Mizui, T., Sekino, Y., Yamazaki, H., Shirao, T. “Bidirectional regulation of dendritic spine morphogenesis during development by AMPA and NMDA receptor activities via postsynaptic actin organization.”
- 14th Neuropharmacology Conference: The Cytoskeleton and Synaptic Function October 20-22, 2004, San Diego, CA, USA. Sekino, Y., Mizui, T., Takahashi, H., Shirao, T. “Dynamics of drebrin A in the dendritic spine of cultured hippocampal neuron”
- Society for Neuroscience 34th Annual Meeting, 2004. Kobayashi, C., Sasagawa, Y., Sekino, Y., Yamazaki, H., Shirao, T.

- “Morphological and electrophysiological analysis of transgenic mice overexpressing GFP-drebrin A”
Society for Neuroscience 34th Annual Meeting, 2004. Ito, M., Doya, K., Shirao, T., Sekino, Y. “Fos imaging reveals that the supramammillary nucleus enhances hippocampal activity of rats placed in a novel open field”
Society for Neuroscience 34th Annual Meeting, 2004. Takahashi, H., Mizui, T., Sekino, Y., Yamazaki, H., Shirao, T. “Bidirectional regulation of dendritic spine morphogenesis during development by AMPA and NMDA receptor activities via postsynaptic actin organization”
- 伊藤真、銅谷賢二、白尾智明、関野祐子「オープンフィールド探索時のラットにおける海馬 c-Fos 発現に対する上乳頭体核イボテン酸破壊の効果」第81回日本生理学会年会、札幌、2004年6月2日～8日
- 高橋秀人、水井利幸、関野祐子、山崎博幸、白尾智明「発生過程のスパインアクチン細胞骨格形成に対する AMPA と NMDA 受容体活動の役割」第81回日本生理学会年会、札幌、2004年6月2日～8日
- 花村健次、水井利幸、白尾智明「海馬神経細胞におけるドレブリンAとPSD95の局在」第47回日本神経化学学会大会第27回日本神経科学大会合同大会、大阪、2004年9月21日～23日
- 水井利幸、高橋秀夫、白尾智明「ドレブリンA過剰発現によるFアクチンとPSD-95の樹状突起フィロポディアへの集積」第47回日本神経化学学会大会第27回日本神経科学大会合同大会、大阪、2004年9月21日～23日
- 山崎博幸、水井利幸、白尾智明「ドレブリン結合タンパク質DBP1の樹状突起スパインでの局在はc末端領域の配列に依存する」第47回日本神経化学学会大会第27回日本神経科学大会合同大会、大阪、2004年9月21日～23日
- 宋明橋、花村健次、三國雅彦、白尾智明「成熟ラット脳内の移動中の神経前駆細胞はドレブリンEを発現しているがドレブリンAは発現していない」第47回日本神経化学学会大会第27回日本神経科学大会合同大会、大阪、2004年9月21日～23日
- 高橋秀人、水井利幸、関野祐子、山崎博幸、白尾智明「樹状突起スパイン形成のAMPA受容体とNMDA受容体活性による二方向性制御」第47回日本神経化学学会大会第27回日本神経科学大会合同大会、大阪、2004年9月21日～23日
- 関野祐子、伊藤真、銅谷賢二、白尾智明「新規場所符号化におけるラット海馬神経活動に対する上乳頭体核の関与」第47回日本神経化学学会大会第27回日本神経科学大会合同大会、大阪、2004年9月21日～23日
- H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
1. 特許取得
- 特願2004-257060
発明者：白尾智明、児島伸彦、山崎博幸、関野祐子、花村健次
発明の名称：シナプス成熟障害モデル動物
出願人：科学技術振興事業団
出願日：平成16年9月3日
- 特願2004-145707
発明者：山崎博幸、関野祐子、白尾智明

発明の名称：樹状突起スパイン移行
配列

出願人：科学技術振興事業団

出願日：平成16年5月14日

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

動物モデルを用いた躁うつ病の再発脆弱性に関する研究

分担研究者 加藤忠史

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 チームリーダー

研究要旨：

本研究の目的は、遺伝子改変モデルマウスを用いて、躁うつ病（双極性障害）の動物モデルを作成し、その病態を解析することである。本研究により躁うつ病のモデル動物が確立できれば、これまでの対症療法的な治療薬でなく、より本質的な病態を改善する予防薬の開発が可能となると考えられる。我々は、ミトコンドリア DNA(mtDNA)の多重欠失による慢性進行性外眼筋麻痺（CPEO）で気分障害を合併すること、双極性障害患者の死後脳で mtDNA 欠失が見られたことに着目し、CPEO の原因遺伝子の1つであるポリメラーゼ γ (POLG)に点変異を導入したモデルマウスを作成し、双極性障害類似の表現型を呈することを見出した。この動物モデルは、今後双極性障害の治療薬開発、病態解明に有用であると思われる。

A. 研究目的

躁うつ病（双極性障害）は、躁状態、うつ状態の再発を繰り返すことにより社会生活障害を来す疾患である。社会生活障害を防ぐには、再発を予防することが重要である。抗うつ薬、抗精神病薬の作用は対症療法的に過ぎず、予防のためには気分安定薬が用いる必要があるが、気分安定薬、特にリチウムは副作用が強いため、治療を中断する患者も少なくない。また、複数の気分安定薬を服用しても、病相をコントロールできない患者も多く存在する。こうしたことから、新規気分安定薬の開発が望まれる。しかし、既存の躁うつ病モデルは、全て「躁状態のモデル」か「うつ状態のモデル」であり、躁・うつの病相を反復するような動物モデルは存在しないため、新たな気分安定薬開発の試みはほとんど行われていなかった。

慢性進行性外眼筋麻痺（CPEO）は、眼瞼下垂などの比較的軽症の筋症状を呈する、成人発症の、比較的軽症のミトコンドリア病である。その病態には、ミトコンドリア DNA(mtDNA)の多重欠失が関与しているこ

とがわかっている。近年、その原因遺伝子が3つ同定された。これら3つの原因遺伝子、すなわちポリメラーゼ γ (POLG)、アデニンヌクレオチドトランスロケター-1 (ANT1)、Twinkle の変異により生じる CPEO は、いずれもうつ病または躁うつ病（双極性障害）を伴う場合が少なくないことが報告されている。一方、我々はこれまで孤発性の双極性障害患者において、脳内およびリンパ球において、mtDNA 欠失が増加していることを報告してきた。したがって、脳特異的に mtDNA を増加させることで、躁うつ病の動物モデルを作成することができると考えた。

本研究の目的は、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と共に、このモデル動物の病態を行動学的、生化学的、生理学的に解析することである。

B. 研究方法

ミトコンドリア遺伝子変異を加速させるため、マウスのミトコンドリア遺伝子複製酵素（ポリメラーゼ γ 、pol γ ）全長 cDNA

の Mg²⁺結合部位に、D181A という一塩基変異を導入し、その校正活性を失わせた変異体を作成した。これに、calmodulin kinase II α (CAMKII α)のプロモーターを連結したジーンコンストラクトを作成し、C57B6/Jマウスの受精卵にインジェクションすることにより、トランスジェニックマウスを作成した。

マウス脳より、RNA および DNA を抽出し、変異型ポリメラーゼ γ の発現量を、ABI 7900HT を用いて、リアルタイム PCR 法により定量した。mtDNA 欠失は、サザンブロット法により定量した。

行動解析は、理化学研究所脳科学総合研究センター動物実験施設において行った。

また、マウスを断頭し、脳を取り出し、海馬切片を作成した。海馬 CA1 錐体細胞にパッチピペットを挿入し、蛍光色素カルシウムグリーンを注入し、細胞内カルシウム濃度を測定し、細胞外から与えた種々の薬物の影響を観察した。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

4 系統作成できた CAMKII α -pol γ マウスのうち、最も変異型ポリメラーゼ γ 発現量の高い 1 系統を、その後の解析に用いた。

このマウスにおいて、ミトコンドリア DNA の欠失を調べたところ海馬および大脳皮質において、約 2kb の欠失型ミトコンドリア DNA の存在が確認された。

この動物において、オープンフィールド試験、高架型十字迷路、長期の行動リズム測定などを行った。

オープンフィールド試験では、行動量の減少が見られた。高架型十字迷路では、open arm への滞在時間の減少が見られ、不安の増強が疑われた。長期の行動リズム測定では、周期的な行動量の変化が見られた。

本トランスジェニックマウスでは、G 蛋白質を介したカルシウムシグナリングが減

衰していることが判明した。

D. 考察

校正機能を失わせたマウスポリメラーゼ γ を過剰に発現させるトランスジェニックマウスを作成し、双極性障害モデル動物となりうることを示した。これらのマウスでは mtDNA 欠失が増加し、躁うつ病類似の行動異常を呈し、カルシウムシグナリングに変化を生じたことから、今後双極性障害モデル動物として、創薬研究に用いることができると考えられた。

E. 結論

我々は、躁うつ病の遺伝的モデルマウスを確立した。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Iwamoto K, Bundo M, Kato T (2005) Altered expression of mitochondria-related genes in postmortem brains of patients with bipolar disorder or schizophrenia, as revealed by large-scale DNA microarray analys. *Hum Mole Genet* 14: 241-53.

2. Munakata K, Iwamoto K, Bundo M, Kato T (in press) Mitochondrial DNA 3243A>G mutation and increased expression of LARS2 gene in the brains of patients with bipolar disorder and schizophrenia. *Biol Psychiatry*

3. Munakata K, Tanaka M, Mori K, Washizuka S, Yoneda M, Tajima O, Akiyama T, Nanko S, Kunugi H, Tadokoro K, Ozaki N, Inada T, Sakamoto K, Fukunaga T, Iijima Y, Iwata N, Tatsumi M, Yamada K, Yoshikawa T, Kato T (2004) Mitochondrial DNA 3644T→C mutation associated with bipolar disorder. *Genomics* 84: 1041-1050

4. Washizuka S, Iwamoto K, Kazuno A, Kakiuchi C, Mori K, Kametani M, Yamada K, Kunugi H, Tajima O, Akiyama T, Nanko S, Yoshikawa T, Kato T (2004) Association of

mitochondrial complex I subunit gene NDUFV2 at 18p11 with bipolar disorder in Japanese and the NIMH pedigrees. *Biol Psychiatry* 56: 483-489.

5. Washizuka S, Kakiuchi C, Mori K, Tajima O, Akiyama T, Kato T. Expression of mitochondria related genes in lymphoblastoid cells from patients with bipolar disorder. *Bipolar Disorder* (in press)

6. Kakiuchi C, Ishiwata M, Kametani M, Nelson C, Iwamoto K, Kato T: Quantification of multiple mitochondrial DNA deletion in the brains of patients with bipolar disorder and schizophrenia. *Int J Neuropsychopharmacol* (in press)

7. Kato T, Ishiwata M, Mori K, Washizuka S, Tajima O, Akiyama T, Kato N (2003) Mechanisms of altered intracellular calcium signaling in transformed lymphoblastoid cells from patients with bipolar disorder. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 6: 379-89.

8. Washizuka S, Ikeda A, Kato N, Kato T (2003) Possible relationship between mitochondrial DNA polymorphisms and lithium response in bipolar disorder. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 6: 421-4.

9. Washizuka S, Kakiuchi C, Mori K, Kunugi H, Tajima O, Akiyama T, Nanko S, Kato T (2003) Association of decreased expression and promotor polymorphisms of mitochondrial complex I subunit gene NDUFV2 with bipolar disorder. *American Journal of Medical Genetics Part B (Neuropsychiatric Genetics)* 120B: 72-78

10. Kato T, Iwamoto K, Washizuka S, Mori K, Tajima O, Akiyama T, Nanko S, Kunugi H, Kato N (2003) No association of mutations and mRNA expression of WFS1/wolframin with bipolar disorder. *Neuroscience Letters* 338: 21-24

11. Kato T, Ishiwata M, Nagai T (2002) Mitochondrial calcium response in human transformed lymphoblastoid cells. *Life Sciences* 71: 581-590

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

ミトコンドリア遺伝子変異が蓄積するトランスジェニック非ヒト哺乳動物（出願中）

出願の種類	特許（通常）
出願人	理化学研究所
出願日	平成 15 年 10 月 21 日
発明者	笠原和起、加藤忠史

2. 実用新案登録

3. その他

抗うつ療法の奏効機転候補分子の機能的評価に関する研究

分担研究者 山田光彦

国立精神・神経センター精神保健研究所 部長

研究要旨：我々はうつ病の病態と治癒機転を理解するために神経回路網の機能的および形態学的変化に注目をしている。これまでにうつ病の治癒機転に関与する候補遺伝子を Antidepressant Related Genes として戦略的に探索し、その機能と発現を解析することを試みた。さらに、得られた候補分子については、先端的生物情報技術と分子生物学的手法を用いてその機能と発現を詳細に検討した結果、これらの候補遺伝子群の一部が軸索の伸展・退縮の調節、神経伝達物質の開口放出に関与する分子クラスターに分類されることがホモロジー解析と定量的遺伝子発現解析により具体的に明らかとすることができた。さらに、これらの候補遺伝子群が神経回路網の再編およびシナプス前機能変化といった神経可塑的变化に重要な役割を果たしていることを培養神経細胞を用いて研究を行った。分担研究者が行った一連の研究は、神経回路網の再編およびシナプス前機能変化といった神経可塑的变化の検討を通して、主任研究者が行う「感情障害の発症脆弱性素因に関する神経発達・神経新生の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」に寄与するものと考えられた。本研究により得られた候補分子群は、真の治療ターゲット分子となり得る可能性を強く示すものであった。本研究は感情障害の病態理解のための独創的アプローチであり、新しい作用機序をもつ自殺防止を目指した医薬品の戦略的開発の基盤となるものである。

A. 研究目的

感情障害は特に自殺率が高くまた患者の経済的生産性が低下するなど社会的損失や患者家族の長期にわたる負担が大きい精神障害である。さらに、慢性的経過や再発を繰り返す等、国家財政における医療経済的負担も大きい。そのため、感情障害の病態を理解し有効な治療法を開発することは我々精神医学研究者にとって急務の課題となっている。近年、ゲノム科学の進展により、分子生物学的研究手法を用いることで感情障害の病態における役割を解明することが可能となってきた。我々は、differential cloning 法を用いて抗うつ薬の奏効機転に関連する遺伝子・EST を探索するプロジェ

クトを開始している。現在までに、複数の候補遺伝子をラット前頭葉皮質から同定し、antidepressant related genes (ADRGs) と名付けて検討を進めている。これら候補遺伝子の機能別クラスタリングを試みた結果、既知遺伝子と高相同性を示した ADRG 遺伝子群の一部は、神経細胞において軸索の伸展、退縮の調節、神経伝達物質の開口放出に関与する分子クラスターに分類されることが明らかとなった。そのため、これらの候補遺伝子群が神経回路網の再編といった神経可塑的变化に重要な役割を果たしている可能性が高いと考えられた。そこで本研究では、抗うつ薬の奏効機転において神経回路網の再編が重要であるという仮説について

検証を行うべく抗うつ療法の奏功機転候補分子の機能的評価に関する研究を進めることを目的とした。

B. 研究方法

(1) 実験動物及び薬物投与：実験には、Sprague-dawley 系雄性ラットを用い、5週齢のものを入荷し2週間環境に馴化させた後、7週齢目より以下の処置を開始した。三環系抗うつ薬のイミプラミン及び選択的セロトニン再取り込み阻害薬のサートラリンをそれぞれ 10 mg/kg、1日1回3週間腹腔内投与した。対照群には溶媒として用いた 1.5% Tween 80 含有生理食塩水を投与した。各処置を負荷したラットは、最終処置から24時間後に断頭し、脳を摘出後、前頭葉皮質、視床下部、線状体、海馬、中脳、視床に分け、液体窒素で素早く凍結後、-80°C 冷蔵庫にて保存した。

(2) Differential Cloning 法：ADRG microarray を用いて解析を進め、発現変化が認められた ADRG 遺伝子については FASTA 法を用いてホモロジー検索を行った。

(3) 抗うつ薬投与による ADRG 遺伝子の発現変化の検討：抗うつ薬投与による ADRG のタンパクレベルでの発現変化は、Western Blot 法により検討した。抗うつ薬を長期又は単回投与したラット前頭葉皮質よりタンパクを抽出した。ポリアクリルアミド電気泳動 (12.5% ゲル) によりタンパクを分離し、ニトロセルロースメンブレンに転写した。3% スキムミルクでブロッキング後、1次抗体、2次抗体とインキュベーションし、ECL 法により抗 ADRG 抗体陽性バンドを検出した。また、透過型電子顕微鏡を用いて神経細胞の形態(微細構造)変化について検討した。

(4) タンパク導入試薬による抗 ADRG 抗体トランスフェクション：PC12 細胞

(2×10^5 cells / 3.5cm dish) をポリ-L-リジンコートしたディッシュに播種し、1日後、血清を含まない培地で3回洗浄し、2 mL の同培地を加えた。タンパク導入試薬 (Chariot) を用いて抗 ADRG 抗体 (1:500) を PC12 細胞に導入し、3時間後、NGF を 50ng/mL となるように添加した。

(5) 抗 ADRG 抗体トランスフェクションによる神経伝達物質の開口放出への影響：PC12 細胞は、ラット副腎髄質褐色細胞腫より単離し株化された細胞であり、NGF の添加により長い神経繊維を伸長し神経様細胞へと分化する。そこで、抗 ADRG 抗体をタンパク導入試薬を用いて PC12 細胞内に導入し、内在性の ADRG 分子の機能を抑制することにより神経伝達物質の開口放出に生じる影響を検討した。導入3日後、 $[^3\text{H}]$ ノルアドレナリン を培養液中に添加し、2時間後、High K 刺激により放出された $[^3\text{H}]$ ノルアドレナリン 量を測定した。放出した量および細胞に残存した量の和を全取り込み量とし、数値は放出量/全取り込み量とした。

(6) 抗 ADRG 抗体トランスフェクションによる神経突起長及び数への影響：抗 ADRG 抗体導入3日後、phosphate buffer saline (PBS) で3回洗浄し、2%パラホルムアルデヒド/PBS で15分間固定し、0.2% Triton X-100/PBS で5分間処理後、FITC ラベル抗ウサギ Ig G 抗体を1時間処置し、PBS で3回洗浄した。さらに、Alexa Fluor 568 phalloidin を20分間処置し PBS で3回洗浄した。共焦点レーザー顕微鏡 MRC 500 (BIO RAD 社製) で観察し、励起波長 488nm と 568nm の画像を取得した。GFP 画像 (488 nm) を抗体導入の指標に、phalloidin 画像 (568 nm) を用いて神経突起長及び数を NIH image 1.62 により計測した。

C. 研究結果

(1) プレシナプスの小胞上に存在する ADRG 遺伝子の同定: ADRG microarray を用いて2次スクリーニングを行った結果、抗うつ薬長期投与により多岐にわたる遺伝子の発現変化が認められた。次に、これらの ADRG 遺伝子について、塩基配列を決定し GeneBank database と同源性検索を行い、既知遺伝子と同源性が高いものについて機能別クラスタリングを行った結果、VAMP2 (ADRG#14)、cysteine string protein (ADRG#55)、Rab3 (ADRG#280)、synapsin I (ADRG#279)、synaptotagmin (ADRG#563) 等、プレシナプスの小胞上に存在するタンパクが多数得られた。プレシナプスの小胞上に存在し、神経伝達物質の開口放出に関与する ADRG のタンパクレベルでの発現変化を検討した結果、抗うつ薬長期投与による発現増加が認められた。一方、プレシナプス膜上に存在する SNAP 25 及び syntaxin に発現変化は認められなかったが、小胞マーカーの synaptophysin 及び secretogranin は顕著に増加していた。続いて、透過型電子顕微鏡を用いてプレシナプスの形態を観察した結果、抗うつ薬長期投与により active zoon の面積が増加している傾向が示された。

(2) 抗うつ薬長期投与による ADRG#14 の発現変化: ADRG microarray の解析の結果、抗うつ薬投与により発現増加が認められた ADRG#14 (VAMP2) のタンパクレベルでの発現変化を Western blot 法により検討した。イミプラミン、サートラリンの長期投与により ADRG#14 の有意な発現の増加が認められたが、これらの抗うつ薬の単回投与で発現変化は認められなかった。

(3) 抗 ADRG 抗体トランスフェクションによる神経伝達物質の開口放出への影響: ADRG#14 をモデルとして検討した。最初に対照群における High K 刺激による

経時変化を検討した結果、刺激後 10 秒で無刺激の約 1.5 倍となり、30 秒で 2 倍となりその後 10 分まで一定であった。一方、抗 ADRG#14 抗体を導入した PC12 細胞では、10 秒、30 秒後ともに放出量の増加が認められなかった。

(4) 抗 ADRG 抗体トランスフェクションによる神経突起長及び数への影響: ADRG#14 をモデルとして検討した。抗 ADRG#14 抗体の PC12 細胞内へのトランスフェクション効率は、導入3日後で 70~80%であった。共焦点レーザー顕微鏡下、対照および抗 ADRG#14 抗体トランスフェクタントを比較したところ、トランスフェクタントでは、神経突起の長さは退縮し、神経突起数も減少していることが認められた。続いてこれを数値化するために、各群、120~150 の細胞について神経突起長および数を計測した。その結果、1 個の細胞における神経突起の合計の長さの平均は、対照群で $95.7 \pm 5.0 \mu\text{m}$ 、トランスフェクタント群では $56.1 \pm 3.7 \mu\text{m}$ であり、神経突起数は、対照群で 3.3 ± 0.3 、トランスフェクタント群では 2.4 ± 0.5 であり有意に減少していた。一方、細胞径には有意差は認められなかった (対照群: $22.0 \pm 0.4 \mu\text{m}$ 、トランスフェクタント群: $22.6 \pm 0.3 \mu\text{m}$)。

D. 考察

現在、新規抗うつ薬の開発は神経伝達物質の薬理学に基づいて行われており、選択的セロトニン再取り込み阻害薬などの開発が進み一定の成果を上げている。しかしながら、これらの抗うつ薬も、シナプス間隙におけるモノアミン濃度を増加させることにより抗うつ作用を発揮するという「モノアミン仮説」に基づく抗うつ薬の限界を超えるものではない。実際、こうした急性薬理作用が脳内において直ちに起こるのに対

して、臨床場面では治療効果の発現に数週間かかることが経験的にわかっており、何らかの遺伝子発現機構を介する神経可塑的变化が大きく関与していると考えられる。そのため、うつ病治療機転の基盤となる神経化学的メカニズムを既存の仮説にとらわれることなく解明することは急務の課題である。

これまでに、我々は Differential Display 法を用いて、対照群に抗うつ薬3週間投与において特異的に発現が増減する複数の cDNA 断片を同定してきた。これらの ADRG 遺伝子について、塩基配列を決定し GeneBank database と相同性検索を行い、既知遺伝子と相同性が高いものについて機能別クラスタリングを行った結果、プレシナプスの小胞上に存在するタンパクが多数得られた。プレシナプスの小胞上に存在するタンパクは、神経伝達物質の開口放出に関与するという報告がある。そこで、ADRG#14 (VAMP2) をモデルとして内在性 ADRG#14 タンパクの機能を抑制した神経様細胞 (NGF で分化させた PC12 細胞) における開口放出能を測定し、続いて神経突起を可視化し、突起長及び数を計測する系を構築した。抗 ADRG#14 抗体を導入した PC12 細胞を高 K により刺激した結果、対照群に比べ有意な抑制が認められた。このことより、内在性 ADRG#14 タンパクの機能が抑制されていることが確認された。次に、共焦点レーザー顕微鏡下、対照および抗 ADRG#14 抗体トランスフェクタントを可視化し比較したところ、トランスフェクタントでは神経突起の長さは退縮し、神経突起数も減少していることが認められた。これを数値化するために、各群、120~150 の細胞について神経突起長および数を計測した結果、トランスフェクタントにおいて有意な神経突起の退縮及び神経突起数の減少が認められた。

一方、本研究においてプレシナプス膜上のタンパク発現は変化せず、小胞マーカータンパクにおいて増加が認められたことから、小胞の数の増加が示唆された。さらに、active zoon の面積の増加傾向は開口放出能の増加を示す可能性が考えられたが今後の詳細な検討を要する。

以上のことより、抗うつ薬のターゲットの1つに、シナプス小胞上のタンパクがあらためて考えられた。これら結果は、抗うつ薬のターゲットの1つと考えられたプレシナプスの小胞上のタンパクの発現変化により、神経伝達物質の開口放出機構の変化等が引き起こされていることを示唆するものである。我々の一連の研究は、偶然の発見に頼ることのない新規中枢神経系治療薬の戦略的、合理的創薬へとつながると期待される。

E. 結論

分担研究者が行った一連の研究は神経回路網の再編成といった神経可塑的变化における機能の検討を通して主任研究者が行う「感情障害の発症脆弱性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」に寄与するものと考えられた。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究成果発表

1. 論文発表

1. Yamada M, Higuchi T, Functional genomics and antidepressant research. European Journal of Neuropsychopharmacol, 12, 235-244, 2002
2. Yamada M, Takahashi K, Tsunoda M, Nishioka G, Kudo K, Ohata H, Kamijima K, Higuchi T, Momose K, Yamada M,

- Differential expression of VAMP2/synaptobrevin-2 after antidepressant and electroconvulsive treatment in rat frontal cortex. *The Pharmacogenomics Journal*, 2, 377-382, 2002
3. 西岡玄太郎,山田光彦:気分障害の分子遺伝学的アプローチ, *精神科*, 1, 449-453, 2002
4. 山田美佐, 山田光彦:抗うつ薬作用機序における神経可塑的变化, *分子精神医学*, 3, 7-12, 2003
5. 山田光彦: 治癒機転の理解を手がかりとした抗うつ薬ゲノム創薬アプローチ、*日本精神神経学雑誌*, 2003
6. Nishioka, G., Yamada, M., Kudo, K., Takahashi, K., Kiuchi, Y., Higuchi, T. Momose, K., Kamijima, K. and Yamada, M.: Induction of kf-1 after repeated electroconvulsive treatment and chronic antidepressant treatment in rat frontal cortex and hippocampus. *J Neural Transm* 110, 277-285, 2003
7. Yamada M, Yasuhara H.: Clinical pharmacology of MAO inhibitors: safety and future. In "Monoamine oxidases: molecular, pharmacological and neurotoxicological aspects" Eds. A. Nicotra, et al., Elsevier (Amsterdam), pp215-pp222, 2004
8. 西岡玄太郎, 山田光彦:気分障害における脳画像研究の進歩. *精神科* 5: 44-47, 2004
9. Takahashi K, Yamada M, Ohata H, Momose K, Higuchi T, Honda K and Yamada M: Expression of Ndr2 in the rat frontal cortex after antidepressant and electroconvulsive treatment. *Int J Neuropsychopharmacol*, 8, 1-9, 2005
10. Kudo K, Yamada M, Takahashi K, Nishioka G, Tanaka S, Hashiguchi T, Fukuzako H, Takigawa M, Higuchi T, Momose K, Kamijima K, Yamada M: Repetitive transcranial magnetic stimulation induces kf-1 expression in the rat brain. *Life Sci*, in press, 2005
11. Yamada, M., Yamada, M., Higuchi, T.: Antidepressant-elicited changes in gene expression -Remodeling of neuronal circuits as a new hypothesis for drug efficacy. *Prog Neuro-psychopharmacol Biol Psychiatry*, in press, 2005
12. Yamada, M., Takahashi, K., Tsunoda, M., Iwabuchi, T., Kobayashi, S., Tsukahara, N., Nakagawa, T., Awatsu, M., Yamazaki, S., Hirano, M., Ohata, H., Nishioka, G., Kudo, K., Tanaka, S., Kamijima, K., Higuchi, T., Yamada, M. and Momose, K.: Antidepressant research in the era of functional genomics. Farewell to the monoamine hypothesis. *Biogenic Amines*, in press, 2005
13. Yamada, M., Iwabuchi, T., Takahashi, K., Kurahashi, K., Ohata, H., Momose, K., Kamijima, K., Higuchi, T. and Yamada, M.: Identification and characterization of frizzled-3 protein: decrease in rat frontal cortex after antidepressant or electroconvulsive treatment. (submitted for publication)

2. 学会発表

1. Takahashi K, Yamada M, Yamada M, Kamijima K, Higuchi T, Momose K, Expression of ndr2 after antidepressant treatment and ECT in rat brain. *Neuroscience Meeting, Orlando*, 2002
2. Kudo K, Yamada M, Hirano M, Takahashi K, Tsunoda M, Nishioka G, Kamijima K, Momose K, Higuchi T, Yamada M, Induction of cysteine string protein after chronic antidepressant and lithium treatment in rat frontal cortex. *CINP*,

Montoreal, 2001

3. Yamada M, Pharmacogenomics and novel therapeutic targets for depression, WPA, Yokohama, 2002

4. 山田光彦、治癒機転解明による創薬ターゲットの探索、第106回日本薬理学会関東部会、東京、2002

5. 山田光彦、治癒機転の解明による抗うつ薬の新規ターゲット分子探索、日本神経精神薬理学会、前橋、2002

6. 山田光彦、山田美佐、高橋弘、角田美果、平野美保、岩渕知子、西岡玄太郎、
7. 工藤謙太郎、大幡久之、上島国利、百瀬和享、樋口輝彦、抗うつ薬奏効機転関連分子としての VAMP2/ synapto-brevin-2 の同定と SNARE complex について、日本神経精神薬理学会、前橋、2002

8. 山田光彦、山田美佐、高橋弘、西岡玄太郎、工藤謙太郎、櫻井恵里子、上島国利、百瀬和享、樋口輝彦、抗うつ薬長期投与による cysteine string protein の発現変化、日本生物学的精神医学会、東京、2002

9. 工藤謙太郎、開発めぐみ、高橋弘、西岡玄太郎、平野美保、角田美果、山田美佐、百瀬和享、上島国利、樋口輝彦、山田光彦、ヒト ADRG34 遺伝子をモデルとした治療抵抗性うつ病責任遺伝子多型の探索、日本精神行動遺伝学会、横浜、2002

10. 山田光彦、開発めぐみ、高橋弘、平野美保、角田美果、西岡玄太郎、工藤謙太郎、山田美佐、百瀬和享、上島国利、樋口輝彦、ADRG34/kf-1 をモデルとしたうつ病治療反応性に関わる遺伝子多型の探索、日本臨床薬理学会、大阪、2002

11. 山田光彦、山田美佐、岩渕知子、高橋弘、角田美果、平野美保、西岡玄太郎、工藤謙太郎、大幡久之、百瀬和享、上島国利、樋口輝彦抗うつ薬奏効機転関連分

子としての frizzled-3 protein の同定と Frz/Wnt シグナリングの役割について

12. Yamada, M. and Higuchi, T.: Pharmacogenomics, neuroplasticity and antidepressant research -beyond the monoamine hypothesis. 2nd Annual Meeting of the International Society of Pharmacogenomics joint meeting with the Pacific Rim Association for Clinical Pharmacogenetics, 2003

13. Takahashi, K., Yamada M. Yamada M, Kamijima K. Higuchi T, Momose K, Characterization of a novel antidepressant related gene 123 in rat frontal cortex. Neurosci Meeting, 2003

14. 山田光彦：神経可塑性変化に注目した抗うつ薬ターゲット分子の探索と機能評価。昭和大学医学部同窓会学術講演会, 2004

15. 山田光彦：治癒機転の解明による抗うつ薬の新規ターゲット分子探索戦略, 創薬薬理フォーラム, 2003

16. 山田光彦：抗うつ薬奏効機転の解明による新規治療ターゲットの探索, 日本精神神経学会, シンポジウム, ポストゲノム時代の精神疾患の遺伝子研究, 2003

17. 山田光彦, 上島国利, 樋口輝彦, 百瀬和享：神経回路網の再編成に注目した新規抗うつ薬ターゲット分子の機能評価, 発表要旨集, 精神神経系薬物治療研究報告会, 2004

18. 山田美佐, 高橋弘, 角田美果, 岩渕知子, 小林真也, 塚原奈津子, 中川知之, 粟津万里, 工藤謙太郎, 西岡玄太郎, 田中聡史, 樋口輝彦, 山田光彦, 百瀬和享：抗うつ薬の奏効機転に関与するラット脳内遺伝子の検討, 第14回高次脳機能障害シンポジウム, 2003

19. 角田美果, 高橋弘, 山田美佐, 岩渕

知子, 塚原奈津子, 西岡玄太郎, 工藤謙太郎, 田中聡史, 上島国利, 樋口輝彦, 百瀬和享, 山田光彦: ラット前頭葉皮質における抗うつ薬と電気けいれん療法による ADRG#14 の発現変化, 第 22 回躁うつ病の薬理・生化学的研究懇話会, 2003

20. 塚原奈津子, 山田美佐, 高橋弘, 角田美果, 岩淵知子, 工藤謙太郎, 西岡玄太郎, 田中聡史, 上島国利, 樋口輝彦, 百瀬和享, 山田光彦: 抗うつ薬関連遺伝子 ADRG#102 の同定及び発現変化, 第 22 回躁うつ病の薬理 生化学的研究懇話会, 2003

21. 高橋弘, 山田美佐, 山田光彦, 樋口輝彦, 百瀬和享: ラット前頭葉皮質での新規抗うつ薬関連遺伝子#123 の同定, 学会抄録集, 第 76 回日本薬理学会, 2003

22. 平野美保, 山田美佐, 山田光彦, 樋口輝彦, 百瀬和享: リチウム及び高頻度経頭蓋的磁気刺激長期負荷後の cysteine string protein の発現変化, 学会抄録集, 第 76 回日本薬理学会, 2003

23. 角田美果, 山田美佐, 山田光彦, 樋口輝彦, 百瀬和享: ラット前頭葉皮質における抗うつ薬と電気けいれん療法による VAMP2/synaptobrevin2 の発現変化, 学会抄録集, 第 76 回日本薬理学会, 2003

24. Yamada, M.: Pharmacogenomics and depression research, antidepressant elicited changes in gene expression. WFSBP Asia-Pacific Congress and 41st Meeting of KSBP, Seoul, 2004.7.9-11.

25. 斎藤頭宜, 山田光彦, 山田美佐, 亀井淳三: 慢性投与モデルを評価系に用いたオピオイドδ受容体作動薬の抗うつ作用の解析. シンポジウム「分子からこころを探る」. 第 34 回日本神経精神薬理学会 第 26 回日本生物学的精神医学会合同年

会, 東京, 2004.7.21-23

26. Yamada, M.: Functionalgenomics in search for novel therapeutic target for novel antidepressant. Showa University International Symposium for Life Sciences 1st Annual Meeting. New Frontiers in Neuroscience Research, Tokyo, 2004.8.31.

27. 山田光彦: 個人至適化医療確立のための抗うつ薬関連遺伝子多型の系統的探索. 第 25 回日本臨床薬理学会年会, 東京, 2004.9.16-18.

28. 山田光彦, 山田美佐, 百瀬和享, 上島国利, 樋口輝彦: 抗うつ薬治療反応性の背景にあるヒト遺伝子多型の系統的探索. 第 37 回精神神経系薬物治療研究報告会, 大阪, 2004.12.10.

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

なし

(3) その他

なし

(参考資料)

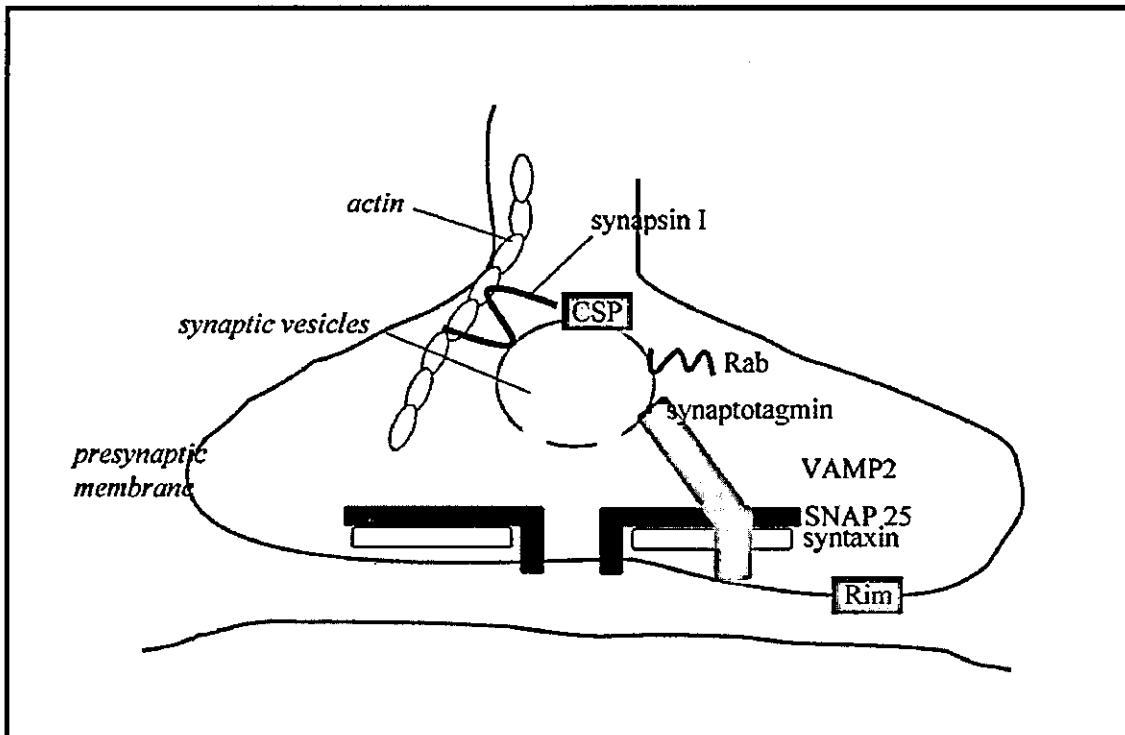


図1. 神経伝達物質の開口放出に関与するプレシナプスタンパク

神経伝達物質の開口放出は、プレシナプスに存在する多数のタンパクの相互作用により引き起こされる。本研究では開口放出に関連する ADRG として ADRG#14 の VAMP 2、ADRG#55 の CSP、ADRG#279 の synapsin I、ADRG#280 の Rab 3、ADRG#425 の Rab1 A、ADRG#563 の synaptotagmin が検出された。

神経ステロイドの脳波学的解析

分担研究者 内山 真

国立精神・神経センター精神保健研究所 精神生理部 部長

研究協力者

鈴木博之、田ヶ谷浩邦、尾崎章子、栗山健一、渋井佳代、有竹清夏

国立精神・神経センター精神保健研究所 精神生理部

研究要旨：睡眠脳波解析と睡眠中の長期増強に関連すると考えられる獲得技能の睡眠後の改善を指標に、ヒトにおける GABA 神経系の高次脳機能回復に関する睡眠中の積極的な過程に関する働きを明らかにすることを目的とした。手続き記憶に関する課題としては、Karni らが開発した視覚弁別課題を用い、FFT 法による睡眠脳波の周波数解析により、手続き記憶の睡眠による向上に関連した睡眠脳波指標を明らかにするとともに、GABAA 受容体クロライドイオンチャンネル複合体に作用するベンゾジアゼピン系睡眠薬であるトリアゾラムを投与した際の手続き記憶の睡眠による向上に与える影響を検討した。その結果、ヒトにおいて、睡眠中に手続き記憶の獲得・強化が行われていることが、明らかになった。これに関してベンゾジアゼピン誘導体は、手続き記憶の獲得・強化に抑制的に働くことがわかった。さらに、この作用は睡眠中の GABA 神経系の活動と関係していることが示唆された。

A. 研究目的

うつ病では、入眠障害、中途覚醒の増加、早朝覚醒など睡眠障害が高頻度で見られ、これらがうつ病の初発症状あるいは再発のサインとして臨床的に重要であることが知られている。うつ病の睡眠を操作することで治療効果が得られることがわかっている。うつ病に対して、薬物投与より一週間ほど眠らせ続ける持続睡眠療法が 20 世紀のはじめに考案され、スルフォナール（睡眠薬）を用いたうつ病の持続睡眠療法が 1950 年代頃までは盛んに用いられた。一方で、うつ病患者に夜間睡眠をとらせない断眠療法の有効性も確かめられ、現在においても一般臨床で用いられている国もある。近年、うつ病の薬物治療において、抗うつ薬と同時に睡眠薬を用いて積極的に不眠を治療した法が、改善度が高いことが報告されてい

る。これらは、うつ病の病態と睡眠に関連した神経機構とは何らかの病態生理的関連を持つことが示唆される。

1980 年代からの Kupfer らのグループを中心としたうつ病の終夜睡眠ポリグラフ研究により、レム睡眠潜時の短縮がうつ病に共通した所見として取り上げられた。また、内因性うつ病ではレム睡眠中の急速眼球運動出現率（レム密度）が上昇していることも報告された。これらの所見は、レム睡眠の出現を支配する概日リズムがうつ病で睡眠スケジュールに対し前進しているため、あるいはレム睡眠と拮抗関係にある徐波睡眠の出現を支配する恒常性維持過程（脳の疲労回復過程）の働きが減弱しているためによると解釈された。これらの終夜睡眠ポリグラフ所見は、縦断研究から、単なる state-dependent な所見ではなく、うつ病の脆

弱性に関連した trait-dependent な所見と考えられている。

このように、うつ病における睡眠の障害は症状レベルにおいても、生理学的所見のレベルでも明らかであるが、これが病態とどのように関わっているかについては依然明らかでない。日常臨床のレベルで考えると、うつ病における夜間睡眠の障害は、脳機能や気分が夜間睡眠によって回復できないことと関係していることが推測される。うつ病の症状は、朝に悪く夕方から夜にかけて徐々に改善するような日内変動を示すことが特徴的である。こうした場合に、就床し翌朝目覚めると再び症状が悪化している。断眠療法で夜間睡眠をとらせないでよくと朝の症状悪化はみられないが、日中の昼寝や次の晩の睡眠で症状が再び悪化する。一方、健常人が日中にストレスやライフイベントに関連した一時的な抑うつを体験しても、一晚眠ると回復することが多い。こうした観点から考えると、うつ病においては、睡眠中に働く高次脳機能や気分に関連した回復過程が障害されていることが疑われる。

高次脳機能回復に関する睡眠中の積極的な過程として、手続き記憶に関する強化が健常人においてみられることが報告され注目を集めている。手続き記憶課題を行った後に、睡眠をとらせるとその成績がさらに向上するが、睡眠をとらせないとこの成績向上がみられないというものである。これは、夜間睡眠においても日中睡眠においても観察され、課題の種類を問わずに起こることがいくつかの実験から明らかにされている。動物実験において、新たな神経回路網が形成される学習の形成期にレム睡眠が増加することやレム睡眠中に神経細胞のレセプター蛋白合成が活発に行われることが示唆されているが、ヒトでみられる手続き記憶の睡眠による増強も、睡眠中のなんらかの神経回路網形成と関連している可能性がある。

神経ステロイドは、脳内でコレステロー

ルから直接合成され、細胞核のステロイド受容体に対する活性がなく、主に GABAA 受容体クロライドイオンチャンネル複合体のステロイド結合部位に作用してこの受容体の機能をアロステリックに調節する作用を持つ。さらに、近年神経ステロイドは NMDA 受容体やシグマ受容体にも作用することが明らかになっている。動物実験では、種々のストレス負荷により脳内ニューロステロイドが変動し、情動や記憶など高次脳機能との関連が考えられている。うつ病モデル動物において、DHEA や PREG が抗うつ作用を示し、選択的シグマ受容体アンタゴニストは、この作用を拮抗する。したがって、これらの抗うつ作用はシグマ受容体を介したものと考えられている。ヒトにおける神経ステロイドの作用については、不安やうつ状態とニューロステロイドの血漿中レベルが相関するとの報告があり、不安障害やうつ病との関連が示唆されている。血漿中 DHEA が低値のうつ病患者に対して DHEA を投与するとうつ状態が改善したという報告がある。抗うつ薬に抵抗性の難治性うつ病への DHEA の効果についての報告がある。これらから神経ステロイドや GABAA 受容体の作用の解明は、ストレス負荷からうつ病発症へといたる病態機序を考える上で重要な示唆を与えるものと考えられる。

われわれは、この点に注目し、睡眠脳波解析と睡眠中の長期増強に関連すると考えられる獲得技能の睡眠後の改善を指標に、ヒトにおける GABA 神経系の高次脳機能回復に関する睡眠中の積極的な過程に関する働きを明らかにすることを目的とした。手続き記憶に関する課題としては、Karni らが開発した視覚弁別課題を用い、FFT 法による睡眠脳波の周波数解析により、手続き記憶の睡眠による向上に関連した睡眠脳波指標を明らかにするとともに、GABAA 受容体クロライドイオンチャンネル複合体に作用するベンゾジアゼピン系睡眠薬であるトリアゾラムを投与した際の手続き記憶の

睡眠による向上に与える影響を検討した。

B. 研究方法

実験 1：手続き記憶の睡眠後向上に関連した睡眠脳波指標の解析

8名の健康な成人（男性2名、女性6名）が実験に参加した（平均 24.5±3.4 才）。研究に参加するにあたり、実施される実験内容、予測される危険性について十分な説明を行い、書面による同意を得た。実験前1週間は飲酒・喫煙をしないよう指示し、毎日の入床時刻、入眠時刻、覚醒時刻、起床時刻の睡眠日誌への記録と、携帯型活動量測定装置（アクチグラフ、Mini Mitter 社製）を用いた連続的な活動量測定を行い、睡眠習慣が規則的であることを確認した。

実験1夜目を順応夜、2夜目を実験夜とするプロトコルを用いた。実験1日目は19時に被験者を集合させ、20時より脳波(10-20法: C3, C4, O1, O2)、眼球運動および筋電図、心電図の電極を装着した。実験は完全空調の隔離実験室で行い、実験室内は温度 24℃、湿度 60%、照度 150lux に保つことで、外部からの音、光、温度が睡眠に与える影響を最大限に除外した。0時から8時まで睡眠を取り、9時に実験室から帰宅した。

2夜目は18時に被験者は実験室に集合し、1夜目と同様に電極装着をおこなった後、21時より視覚弁別課題を行った。0時に消灯し8時の起床まで終夜睡眠ポリグラフィを試行した。起床後9時より朝食を取り、11時に再び視覚弁別課題を行い、課題終了をもって実験の終了とした。視覚弁別課題は25回のセッションから成り立ち、回数を増すごとに刺激間隔の減少により難易度が高くなる。各刺激間隔における正答率をグラフ化し、正答率が80%にまで低下したときの刺激間隔(ms)を算出し、これを課題成績とした。睡眠前後の課題成績の差を求め、成績向上量とした。

睡眠ポリグラフ記録に対し、30秒ごとに Rechtschaffen & Kales の基準に従って視察

による睡眠段階判定を行った。脳波データは時定数 0.3 秒、ハイカットフィルタ 60Hz で記録され、サンプリング周波数 200Hz でデジタル化された。C3-A2 導出脳波に対して PASS PLUS (Delta Software, St. Louis) を用いて FFT 解析を行った。FFT 解析は 5.12 秒のウェルチテーパウインドウを 2.62 秒の重なりを持って移動させることにより、30 秒間のデータに対して 12 のデータを算出した。上記の手続きにより、Delta(0.3-3Hz)、Theta(3-8Hz)、Alpha(8-12Hz)、Sigma(12-15Hz)、Beta(15-20Hz)各周波数帯域の 30 秒間あたりのパワー値を算出した。

視覚弁別課題は、Karni の開発したものをを用いた。視覚弁別課題とは、特定の対象（目標刺激）を、それとは異なった特性をもつ複数の対象（妨害刺激）の中から視覚的に見つけ出す課題である。視覚的探索とも呼ばれる。妨害刺激に対して、単一の特徴だけが異なる目標刺激を見つけ出す課題（特徴探索 feature search）では、目標刺激が目に見え始めるように見える。この現象を pop-out と呼び、探索時間が妨害刺激の数に依存しない並列走査が行われる。課題の内容は、以下の通りである。被験者は注視点が画面中央に表示された後、注視点を見つめながらボタンを押す。刺激が 17ms 表示される。水平の短い線分を背景に、中心に L か T が回転したもの、四分分割された視野の一つに斜めの線分が縦か横かに 3 つ並んで表示される。刺激図版は中心に T、左下の視野に横に並んだ斜めの刺激が表示されている。ブランクが 300-0ms 表示される。この表示時間が短いほど、刺激の認識が困難となる。この後マスク刺激が刺激の残像を妨害する。マスク表示後、被験者は刺激図形の中心部が L か T か、3 つの斜めの線分が縦並びか横並びかを判断する。これらは、すべて自動化されたコンピュータプログラムにより、ビデオディスプレイ上に提示された。ブランクの時間を 400ms から順次、300ms、200ms、160ms、120ms、100ms、80ms、60ms、40ms、20ms、0ms と順次短縮

していった。400ms から 160ms までは 50 回の試行を行い、120ms 以下では 150 回の試行を行った。全試行終了には、90 分かかった。

実験 2：トリアゾラムの手続き記憶の睡眠後向上に与える影響

対象として健康な 20 歳から 22 歳の規則的な生活を送っている成人男性 8 名が参加した。1 週間の間隔をあけて 1 人の被験者が 2 回の実験セッションに参加した。各実験セッションにおいて、トリアゾラム 0.25mg の入った不透明なゼラチンカプセルまたは、乳糖を同じカプセルに入れたプラセボを double blind cross-over manner で被験者に投与した。

実験 1 日目は、17 時に時間隔離ユニットに集合し、終夜睡眠ポリグラフ検査のための電極装着を行い、24 時に就床させ、終夜睡眠ポリグラフ記録を行った。実験第 2 日目は 8 時に起床し、隔離実験室内で自由に過ごさせた。24 時に就床させ、終夜睡眠ポリグラフ記録を行った。実験 3 日目は 8 時に起床させ、実験第 2 日目と同様に実験者のモニターのもと隔離実験室内で自由に過ごさせた。22 時より視覚弁別課題を課した後、23 時にトリアゾラム 0.25mg またはプラセボを投与し、24 時に就床させ、終夜睡眠ポリグラフ記録を行った。実験第 4 日目は、8 時に起床させ充分覚醒したことを確認した後、10 時より視覚弁別課題を課した。視覚弁別課題が終了した後に各実験セッションを終了した。

解析方法や課題提示の手順などについては、実験 1 と同様である。

(倫理面への配慮)

本研究においては、国立精神・神経センター国府台地区倫理委員会の承認を得て行った。実験参加者に対しては、研究の目的・趣旨・方法・予測される危険性等についての十分な説明を行い、さらに書面による同意を得た。

C. 研究結果

実験 1：手続き記憶の睡眠後向上に関連した睡眠脳波指標の解析

7 名の参加者に成績向上が認められ、1 名はわずかな低下を示した。平均向上量は 15.0 ± 11.8 msec であった。最大向上量は 36.7ms、低下した参加者は 1.7ms の低下であった。睡眠時間は 465.5 ± 2.8 分、睡眠段階 1 (S1)出現時間は 31.6 ± 11.0 分、睡眠段階 2 (S2)出現時間は 241.1 ± 33.0 分、睡眠段階 3+4 (SWS)出現時間は 81.1 ± 34.4 分、レム睡眠 (SREM)出現時間は 111.8 ± 23.2 分であった。各睡眠段階と向上量の関係をピアソンの相関係数を用いて検討した結果、S1: $r = -0.14$, $p = 0.74$, S2: $r = -0.24$, $p = 0.58$, SWS: $r = 0.28$, $p = 0.52$, SREM: $r = 0.03$, $p = 0.95$ であり、全ての睡眠指標において有意な相関は見られなかった。

次に一晩の睡眠を前半と後半に分けて、それぞれの睡眠指標と向上量との関係を検討した。睡眠前半の各睡眠段階出現時間は、S1: 13.0 ± 7.4 分、S2: 115.1 ± 24.6 分、SWS: 65.3 ± 23.6 分、SREM: 37.4 ± 7.3 分であった。睡眠後半では S1: 18.6 ± 7.0 分、S2: 125.9 ± 20.5 分、SWS: 15.8 ± 14.6 分、SREM: 74.3 ± 19.1 分であった。前半と後半の睡眠段階出現時間を対応のある t 検定を用いて比較したところ、S1: $t = -1.712$, $p = 0.13$, S2: $t = -0.98$, $p = 0.36$, SWS: $t = 7.37$, $p = 0.0002$, SREM: $t = -6.05$, $p = 0.0005$ であり、前半の睡眠に SWS が、後半の睡眠に REM がそれぞれ有意に多く出現していることが確かめられた。これらの睡眠変数と向上量の関係を検討した結果、睡眠後半 (4 時から 8 時) の SWS 出現時間と向上量に有意な正の相関が認められた ($r = 0.728$, $p < 0.038$)。前半後半ともに、その他の睡眠段階と向上量の間には有意な相関は認められなかった。睡眠中の各周波数帯域のパワー値は、Delta: 62.72, Theta: 9.06, Alpha: 2.56, Sigma: 1.04, Beta: 0.66 であった。向上量との相関を求めたところ、全ての帯域との間に有意な相関は認められなかった。

睡眠前半の各周波数帯域のパワー値は、

Delta: 84.89, Theta: 11.19, Alpha:2.95, Sigma:1.10, Beta: 0.67であった。睡眠後半の各周波数帯域のパワー値は、Delta: 40.40, Theta: 6.92, Alpha:2.16, Sigma:0.97, Beta: 0.65であった。前半の睡眠と後半の睡眠で各周波数帯域のパワー値を比較したところ、Delta: $t = 4.12, p = 0.0045$, Theta: $t = 3.99, p = 0.0053$, Alpha: $t = 2.944, p = 0.02$, Sigma: $t = 0.86, p = 0.042$, Beta: $t = 0.10, p = 0.92$ であった。睡眠前半の Delta, Theta, Alpha 帯域のパワー値が有意に大きかった。これらの睡眠変数と向上量の関係を検討した結果、睡眠後半のノンレム睡眠中に出現した Delta 帯域のパワー値と向上量の間に関連が認められた ($r = 0.729, p < 0.038$)。

実験 2: トリアゾラムの手続き記憶の睡眠後向上に与える影響

8 例における視覚弁別課題の成績について、paired t-test を用いて検討したが、トリアゾラムの投与による有意な変化はみられなかった。このため、トリアゾラム投与後の変化が 10%未満であったものを不変例、10%以上改善したものを改善例、10%以上の悪化を示したものを悪化例として検討した。この結果、悪化例が 4 例、不変例が 3 例、改善例が 1 例であった。

トリアゾラム投与によりいずれの群においても、視察判定より得られた睡眠段階 2 の増加と睡眠段階 3+4 の減少が全例でみられた。悪化例、不変例、改善例で特徴的な変化はみられなかった。

3 群について、終夜睡眠ポリグラフで得られた睡眠脳波のパワー値についてトリアゾラム投与による変化を検討した。その結果、デルタ帯域およびシータ帯域パワー値に関しては、3 群で一定した変化はみられなかった。アルファ帯域パワー値については、悪化例では 19%減少、不変例では 7%減少、改善例では 1%減少であった。シグマ帯域パワー値については、悪化例では 62%増加、不変例では 23%の増加がみられ、改善例においては 2%とほぼ変化がみられなかった。

D. 考察

本研究で用いた視覚弁別課題は Karni (1991)が開発したものであり、課題成績の向上が特定の視野にのみ起こること、背景と刺激の方向の関性に依存することを示し、課題実行に伴うヒトの視覚野の可塑性をあらわした。さらに視覚弁別課題の成績向上には睡眠が必要であることが実験的に示されており、学習機能が長期記憶増強に関わる機能と近似の機構である事を示唆する所見として注目を集めている。

実験 1 では統制された条件下において手続き記憶測定課題である視覚弁別課題を行い、視察による睡眠段階判定と FFT による周波数解析法を用いた睡眠脳波解析による分析を行い、睡眠前後の課題向上量との関係を検討したものである。その結果、睡眠後半の深いノンレム睡眠と手続き記憶の向上量が有意な正の相関を示すこと、睡眠後半の Delta 帯域出現量と向上量が有意な正の相関を示すことが明らかになった。睡眠後半に脳が休息していることがこの手続き記憶学習の向上に関わっていると考えられた。

従来手続き記憶の向上にはレム睡眠が大きく関わると思われてきた。Karni et al. (1994)はレム睡眠を選択的に奪った場合、視覚弁別課題の成績が向上しないことを報告した。Stickgold et al. (2000)は睡眠後半のレム睡眠出現量が成績向上に大きく関わっていることを示した。しかし、本実験においては総睡眠時間、睡眠前半、後半全てにおいて、レム睡眠と向上量の間には有意な相関が認められなかった。先行研究における結果との相違は、本実験においてレム睡眠出現過程が阻害されなかったことによると思われる。本実験においてレム睡眠出現量は平均 111 分であり、全体の睡眠時間に占める割合は 23.3%であった。この値は健康成人における標準的な値である。さらに睡眠前半においては平均 37.4 分、後半では 74.3 分と睡眠経過に伴い増加を示した。