

200500323A

厚生労働科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業

(H17-長寿-004)

モノアミン系の加齢変化とうつ病の
解明・予防に関する研究

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 城川哲也

平成18(2006)年3月

目次

I . 総括研究報告書	
モノアミン系の加齢変化とうつ病の解明・予防 に関する研究	1
城川哲也	
II . 分担研究報告書	
1. 加齢にともなうモノアミン系の相互作用に関する 電気生理学・形態学的評価	7
城川哲也	
2. 加齢にともなうモノアミン系の相互作用に関連する 遺伝子解析	9
磯部健一	
3. ヒト加齢脳におけるモノアミン関連遺伝子の発現 分布と相互作用の解析	11
小阪憲司	
III . 研究成果の刊行に関する一覧表	14
IV . 研究成果の別刷	15

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
総括研究報告書

モノアミン系の加齢変化とうつ病の解明・予防に関する研究

主任研究者 城川哲也 日本福祉大学情報社会科学部 教授

研究要旨：不安やうつ状態は自殺を引き起こす大きな要因であるが、とりわけ中高年の自殺の増加は深刻な社会問題となっている。本研究は、加齢に伴ううつ病を理解するキーワードとして、ノルアドレナリン(NA)系およびセロトニン(5-HT)系の前頭葉での相互作用に着目して行われた。本年度は、加齢ラットを用いた電気生理学的解析およびマウスを用いた5-HT代謝解析に加えて、ブレインバンク試料を用いた脳由来神経栄養因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)の遺伝子多型についての解析が行われた。その結果、1)モノアミン神経終末の相互作用が17月齢を中心に見られ、2)特異的神経毒により変性した5-HT神経終末に対して、抗うつ薬 maprotiline が5-HT終末の再生を促進することが確認されたこと、3)マウスのうつモデルを用いて、脳内5-HT代謝に関与するトリプトファンヒドロキシラーゼ (TPH-2) およびインドールアミン酸素添加酵素 (IDO) の活性について生化学的に検討を行ったところ、うつモデル群では対照と比較して、前頭葉、海馬、扁桃体において5-HTとキヌレニンの濃度が上昇していたことが明らかになった。さらにBDNFがモノアミン系の相互作用に関与している可能性を検討するために、うつ病患者の脳におけるBDNF関連遺伝子の発現とモノアミン系の病変との関連について解析を開始した。

予防法の開発を目指す上で極めて有効

A. 研究目的

脳内モノアミン系の相互作用の解析は、モノアミン系が関与するとされている気分障害やうつ病の機序を解明し、その

であると思われる。特に、加齢に伴うモノアミン系の異常を解明することは、高齢者のうつ病対策のヒントとなること

を理解することは困難であることから、うつ病患者の脳サンプルの解析も必須である。本年度はこうした観点から研究を開始し、加齢ラットの前頭葉におけるモノアミン系の相互作用を示唆するデータが得られ、マウスのうつモデルからは、5-HT代謝酵素の動態が得られた。さらに、BDNFがモノアミン系の相互作用に関与している可能性を検討するために、うつ病患者脳のBDNF関連遺伝子の発現とモノアミン系の病変との関連について解析を開始した。

B. 研究方法

(1) 加齢ラットの解析

加齢ラット（3～24月齢）の青斑核（LC）および背側縫線核（RD）から単一ニューロン活動を記録し、前頭葉における共通の投射部位での終末の分布と発芽の程度を電気生理学的に調べた。また、NAおよび5-HT神経終末を免疫組織化学的に染色し、電気生理学データと比較した。

(2) マウスうつモデルの解析

母親からの分離によるマウスのうつモデルを用いて、前頭葉、海馬、扁桃体に

おける5-HT代謝に関与する酵素 TPH-2、IDO の活性について生化学的に検討を行った。

(3) ブレインバンクサンプルの解析
ブレインバンクサンプルを対象に fragment length PCR 法を用いて BDNF 遺伝子多型解析を行った。

(倫理面への配慮)

動物実験はそれぞれの施設の実験動物委員会の倫理規定に従った。人脳サンプルについては、生命倫理面および個人情報管理面で細心の注意を払った。ヘルシンキ宣言、遺伝学的検査に関するガイドライン、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針および疫学研究に関する倫理指針に準拠した。

C. 研究結果

(1) 前頭葉の投射部位における発芽が17月齢を中心にいずれの終末においても増加し、LCニューロンとRDニューロンの終末間での相互作用が示唆された。5-HT特異的神経毒の投与によって変性した5-HT神経終末に対して、抗うつ薬 maprotiline が5-HT終末の再生を促進することが確認された。一方、変性した

NA神経終末に対して maprotiline は再生を促進しなかった (城川).

(2) 母親からの分離によるうつモデル群では, 対照と比較して, 前頭葉, 海馬, 扁桃体のいずれの部位においても, 5-HT とキヌレニンの濃度が上昇していた. 後者は炎症性ストレスによってトリプトファンから合成されることから, 同じくトリプトファンから合成される5-HTの合成が炎症性ストレスの影響を受けることが示唆された (磯部).

(3) BDNF遺伝子多型解析から, アルツハイマー病およびレビー小体病患者の脳においては有意な相関性は見られなかった. 今後, うつ病患者の脳サンプルにおけるBDNF関連遺伝子発現を調べ, モノアミン系の病変との関連性についての解析を進めていく (小阪).

D. 考察

(1) 前頭葉におけるNAおよび5-HT神経終末の発芽がいずれも17月齢を中心に増加したことから, 加齢に伴うモノアミン終末間での相互作用が示唆された. 5-HT神経終末の再生が, 抗うつ薬であるNA取り込み阻害薬 maprotiline の投与

によって促進されたことから, うつ病の回復にNA系から5-HT系への働きかけが重要な役割を果たしている可能性が示唆された.

(2) うつモデル群において THP-2 あるいはIDOが活性化され, 5-HTのみならずキヌレニン濃度が上昇したことは, うつ発症あるいは神経細胞死に何らかの関与が考えられる. THP-2, IDO 遺伝子発現をin situ で検索する予定である. 今後実験条件をさらに検討することでうつ発症に関与するこれらの酵素の役割が明らかにし, その機序を解明することがうつ病の予防につながることを期待される.

(3) 我々はこれまで, ラット前頭葉におけるLC-NA終末の維持と発芽が脳内BDNFの影響下にあることを明らかにしてきた (Matsunaga et al. 2004, Matsunaga et al. in press, Nakai et al in press). また5-HT終末もBDNFによって顕著な再生を示すことが報告されている. 一方, 抗うつ薬がBDNFの脳内動態に影響を及ぼすことが報告されていることから, 抗うつ薬がBDNFを介してモノアミン系に作用している可能性がある.

こうした理由から、うつ病患者脳のBDNF
関連遺伝子の発現とモノアミン系の病
変との関連について解析を行う意義が
ある。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

論文発表

城川哲也、石田佳幸、松永渉、中井定、
磯部健一 モノアミン投射系の加齢変
化と可塑性 日本神経精神薬理学雑誌
25:43-48, 2005.

Sakaguchi, T., Shirokawa, T.,
Nakamura, S., and Ohno, E. The mode of
axonal branching of locus coeruleus
neurons projecting to the frontal
cortex and lateral geniculate nucleus
in adult rats: An
electrophysiological study. Priming
BioMedicine, 1: 38-44, 2005.

Nakai, S., Matsunaga, W., Ishida, Y.,
Isobe, K. and Shirokawa, T. Effects of

BDNF infusion on the axon terminals of
locus coeruleus neurons of aging rats
Neuroscience Research, in press.

Nakai, S., Matsunaga, W., Isobe, K.
and Shirokawa, T. Age-dependent
interactive changes in serotonergic
and noradrenergic cortical axon
terminals in F344 rats. Neuroscience
Research, in press.

Matsunaga, W., Isobe, K. and
Shirokawa, T. Involvement of
neurotrophic factors in aging of
noradrenergic innervations in
hippocampus and frontal cortex.
Neuroscience Research, in press.

磯部健一、羽根田正隆、石田佳幸、伊
藤佐知子 B細胞の分化；形質細胞への
分化とストレス応答 Annual Review免
疫 2006.

磯部健一；老化と免疫反応から慢性疾
患の病態生理にせまる仮説 現代医学
53, 2005. 43-49.

Tsuda M, Watanabe T, Seki T, Kimura T, Sawa H, Minami A, Akagi T, Isobe K, Nagashima K, Tanaka S. Induction of p21(WAF1/CIP1) by human synovial sarcoma-associated chimeric oncoprotein SYT-SSX1. *Oncogene* 24(54): 7984-90, 2005.

Ito S, Sawada M, Haneda M, Fujii S, Oh-Hashi K, Kiuchi K, Takahashi M, Isobe K. Amyloid-beta peptides induce cell proliferation and macrophage colony-stimulating factor expression via the PI3-kinase/Akt pathway in cultured Ra2 *FEBS Lett.* 579: 1995-2000, 2005

Isobe K., Ito S, Haneda M, Ishida Y. Cellular and systemic defense system against age-promoting stimuli. *Nagoya J. Med.* 68: 9-18, 2006.

Fujishiro H, Umegaki H, Isojima D, Akatsu H, Iguchi A, Kosaka K. Depletion of cholinergic neurons in

the nucleus of the medial septum and the vertical limb of the diagonal band in dementia with Lewy bodies. *Acta Neuropathol.* 111: 109-114, 2006.

Togo T, Isojima D, Akatsu H, Suzuki K, Uchikado H, Katsuse O, Iseki E, Kosaka K, Hirayasu Y. Clinical features of argyrophilic grain disease: a retrospective survey of cases with neuropsychiatric symptoms. *Am J Geriatr Psychiatry.* 13: 1083-1091, 2005.

Mitsuda N, Yamagata HD, Zhong W, Aoto M, Akatsu H, Uekawa N, Kamino K, Taguchi K, Yamamoto T, Maruyama M, Kosaka K, Takeda M, Kondo I, Miki T. A novel alternative splice variant of nicastrin and its implication in Alzheimer disease. *Life Sci.* in press.

Yamamoto R, Iseki E, Marui W, Togo T, Katsuse O, Kato M, Isojima D, Akatsu H, Kosaka K, Arai H. Non-uniformity in

the regional pattern of Lewy pathology in brains of dementia with Lewy bodies. *Neuropathology* 25: 188-194, 2005.

hippocampus-related candidate genes for Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 57: 585-588, 2005.

Zhong W, Yamagata HD, Taguchi K, Akatsu H, Kamino K, Yamamoto T, Kosaka K, Takeda M, Kondo I, Miki T. Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase is a novel risk gene for Alzheimer disease. *J Neurol Sci.* 238: 53-57, 2005.

Satoh K, Hata M, Shimizu T, Yokota H, Akatsu H, Yamamoto T, Kosaka K, Yamada T. Lib, transcriptionally induced in senile plaque-associated astrocytes, promotes glial migration through extracellular matrix. *Biochem Biophys Res Commun.* 335: 631-636, 2005.

Taguchi K, Yamagata HD, Zhong W, Kamino K, Akatsu H, Hata R, Yamamoto T, Kosaka K, Takeda M, Kondo I, Miki T. Identification of

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

加齢にともなうモノアミン系の相互作用に関する電気生理学・形態学的
評価

分担研究者 城川哲也 日本福祉大学情報社会科学部 教授

研究要旨：中高年の自殺の背景にはうつ病があり、今後さらに高齢化が進む我が国において、うつ病の解明と予防は急務となっている。本研究では、加齢に伴ううつ病の機序として、ノルアドレナリン(NA)系およびセロトニン(5-HT)系の相互作用に着目し、加齢動物を用いた電気生理学的解析を行った。ラットの青斑核よりNAニューロン、背側縫線核より5-HTニューロンを記録し、前頭葉に投射する神経終末の加齢変化を電気生理学的に解析した。その結果、1)モノアミン神経終末の相互作用が17月齢を中心に見られ、2)特異的神経毒により変性した5-HT神経終末に対して、抗うつ薬 maprotiline が5-HT終末の再生を促進することが確認された。

A. 研究目的

中高年の自殺の背景にはうつ病があり、今後さらに高齢化が進む我が国において、うつ病の解明と予防は急務となっている。本年度は、加齢に伴ううつ病の機序として、ノルアドレナリン(NA)系およびセロトニン(5-HT)系の相互作用に着目し、加齢動物を用いた電気生理学的・形態学的解析を行った。

B. 研究方法

(1) 電気生理学

加齢ラット（3～24月齢）の青斑核(LC)および縫線核(RD)からニューロンを記録し、それぞれの投射部位である前頭葉における神経終末の発芽の程度を電気生理学的に調べ、終末間の相互作用について解析した。

(2) 免疫組織化学

NAおよび5-HT神経終末を免疫組織化学

的に染色し、電気生理学的解析結果と比較した。

(3) 特異的神経毒抗うつ薬投与実験
NAニューロンあるいは5-HTニューロンに特異的な神経毒を投与し、NAニューロンと5-HTニューロン間の相互作用について解析した。

(倫理面への配慮)

実験中にはラットに苦痛を与えぬよう十分に配慮した。

C. 研究結果

(1) 前頭葉の投射部位における発芽が17月齢を中心になぜの終末においても増加し、LCニューロンとRDニューロンの終末間での相互作用が示唆された。

(2) 特異的神経毒の投与によって変性した5-HT神経終末に対して、抗うつ薬

生を促進しなかった。

D. 考察

(1) 前頭葉におけるNAおよび5-HT神経終末の発芽がいずれも17月齢を中心に増加したことから、加齢に伴う両終末間での相互作用が示唆された。

(2) 5-HT神経終末の再生が、抗うつ薬であるNA取り込み阻害薬 maprotiline の投与によって促進されたことから、うつ病の回復にNA系から5-HT系への働きかけが重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

E. 健康危険情報

特になし

F. 研究発表

(1) 論文発表

城川哲也、石田佳幸、松永渉、中井定、磯部健一 モノアミン投射系の加齢変化と可塑性 日本神経精神薬理学雑誌 25:43-48, 2005.

Sakaguchi, T., Shirokawa, T., Nakamura, S., and Ohno, E. The mode of axonal branching of locus coeruleus neurons projecting to the frontal cortex and lateral geniculate nucleus in adult rats: An electrophysiological study. Priming BioMedicine, 1: 38-44, 2005.

Nakai, S., Matsunaga, W., Ishida, Y., Isobe, K. and Shirokawa, T. Effects of BDNF infusion on the axon terminals of locus coeruleus neurons of aging rats. Neuroscience Research, in press.

Nakai, S., Matsunaga, W., Isobe, K. and Shirokawa, T. Age-dependent interactive changes in serotonergic and noradrenergic cortical axon terminals in F344 rats. Neuroscience Research, in press.

Matsunaga, W., Isobe, K. and Shirokawa, T. Involvement of neurotrophic factors in aging of noradrenergic innervations in hippocampus and frontal cortex. Neuroscience Research, in press.

(2) 学会発表

松永渉、磯部健一、城川哲也、ノルアドレナリン終末と神経栄養因子の加齢変化 第28日本神経科学大会, 2005年7月26~28日, 横浜.

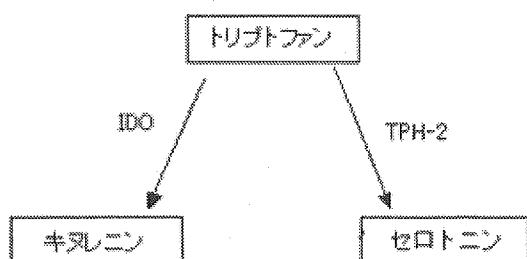
加齢にともなうモノアミン系の相互作用に関連する遺伝子解析

分担研究者 磯部健一 名古屋大学大学院医学系研究科分子細胞免疫 教授

研究要旨：本年度は、マウスのうつモデルを用いて、脳内セロトニン代謝に関与する特異的酵素トリプトファンヒドロキシラーゼ（TPH-2）およびインドールアミン酸素添加酵素（IDO）の活性について生化学的解析を行った。その結果、うつモデル群では対照と比較して、前頭葉、海馬、扁桃体のいずれの部位においても、セロトニンとキヌレニンの濃度が上昇していた。

A. 研究目的

高齢者のうつの問題はこれからの日本の重要な課題である。セロトニンはトリプトファンからつくられ、最近脳内に特異的に存在する TPH-2酵素がそれを選択的に触媒することが判明した（Science 305: 217; 2004）。一方、トリプトファンは炎症性刺激によって活性化されるIDOによってキヌレニンに変化する（下図）。これらのことからうつに関係するセロトニン神経終末はノルアドレナリンを介する精神的ストレスと、炎症性ストレスに大きく影響をうけることが予想される。今年度我々は、母親からの分離によるうつに着目し、そのメカニズムを知るためにマウスモデルで実験をした。



B. 研究方法

(1) マウスモデル

ICRマウスを生後21日で親から分離しない群(1群7匹)、一匹ずつ分離する(孤独)群に分け、それぞれ1か月間飼育後に脳の各組織(前頭葉、海馬、扁桃体)を分離し、以下の生化学分析を行った。

(2) 生化学的測定

HPLCによる脳の各部位のトリプトファン、キヌレニン、セロトニン測定を行った。

(倫理面への配慮)

実験中にはマウスに苦痛を与えぬよう十分に配慮した。

C. 研究結果

各組織におけるトリプトファン(TRY)、キヌレニン(KYN)、セロトニン(5HT) の変化
(海馬)

コントロール群に比較して孤独群でKYNの値が1.278から1.559に上昇した。TRY

5HTは1.221に対し2.012 に上昇した。

(扁桃体)

コントロール群に比較して孤独群でKYNの値が1.274から1.533に上昇した。

TRYも62.624から76.940に上昇した。5HTは3.774から5.299 に上昇した。

その他 前頭葉も扁桃体と同様な傾向を示した。

C. 考察

今回孤独飼育においてTHP-2 酵素あるいはIDOが活性化され、5HTのみでなくKYNが上昇したことは孤独下におけるうつ発症あるいは神経細胞死になんらかの意味をもつものと考えられる。THP-2, IDO遺伝子の発現をin situ 等で検索する予定である。今後実験条件をさらに検討することでうつ発症に関与するこれらの酵素の働きがわかるとともにそのメカニズムを明らかにすることがうつの予防につながるかもしれない。また、老化マウスによって高齢者のうつのモデル実験を行うことが可能と考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(1) 論文発表

磯部健一、羽根田正隆、石田佳幸、伊藤佐知子 B細胞の分化；形質細胞への分化とストレス応答 Annual Review 免疫 2006.

磯部健一；老化と免疫反応から慢性疾患の病態生理にせまる仮説 現代医学 53, 2005. 43-49.

Tsuda M, Watanabe T, Seki T, Kimura T, Sawa H, Minami A, Akagi T, Isoobe K, Nagashima K, Tanaka S. Induction of p21(WAF1/CIP1) by human synovial sarcoma-associated chimeric oncoprotein SYT-SSX1. Oncogene 24(54): 7984-90, 2005.

Ito S, Sawada M, Haneda M, Fujii S, Oh-Hashi K, Kiuchi K, Takahashi M, Isoobe K. Amyloid-beta peptides induce cell proliferation and macrophage colony-stimulating factor expression via the PI3-kinase/Akt pathway in cultured Ra2 FEBS Lett. 579: 1995-2000, 2005

Isoobe K., Ito S, Haneda M, Ishida Y. Cellular and systemic defense system against age-promoting stimuli. Nagoya J. Med. 68: 9-18, 2006.

(2) 学会発表

磯部健一、羽根田正隆、木村賢哉、伊藤佐知子 アルツハイマー病A-betaがミクログリアを活性化させるメカニズム (第4報)第34回日本免疫学会 2005年12月14日 横浜

羽根田正隆、石田佳幸、磯部健一 生体内 (免疫系、特に B リンパ球)での GADD34 の機能 2005. 12.13.

石田佳幸、羽根田正隆、樋田大輔、磯部健一 免疫組織化学による免疫、血液系の発生、分化研究 (第1報; B細胞分化) 2005. 12. 13

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

ヒト加齢脳におけるモノアミン関連遺伝子の発現分布と相互作用の解析

分担研究者 小阪憲司 日本福祉大学情報社会システム研究所 客員研究所員

研究要旨：本年度はノルアドレナリン(NA)系およびセロトニン(5-HT)系の機能と維持に深く関与する脳由来神経栄養因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)の遺伝子多型解析についてブレインバンクサンプルを用いて行った。その結果、アルツハイマー病およびレビー小体病患者の脳においては有意な相関性は見られなかった。現在、うつ病との関連性についての解析を準備中である。

A. 研究目的

城川らのラット加齢脳での研究から、前頭葉や海馬におけるNA線維の機能と維持にはBDNFが重要な役割を果たしていることが示唆されている(Matsunaga et al. 2004, in press)。BDNFは5-HT線維の維持にも関与することが知られており、BDNFのモノアミン系への関与の可能性は高いと考えられる。一方、種々の抗うつ薬がBDNFの脳内動態に影響を及ぼすことが報告されていることから、抗うつ薬がBDNFを介してモノアミン系に作用している可能性もある。この観点より、うつ病患者の脳におけるモノアミンとBDNF関連遺伝子の解析を開始した。

B. 研究方法

ブレインバンクの遺伝子解析
書面にて承諾を得た剖検サンプルを用いて遺伝子多型解析を行った。本年度は、BDNFの多型解析をfragment length PCR法を用いて行った。
(倫理面への配慮)

ブレインバンクに関しては、生命倫理面

および個人情報管理面では、細心の注意を払っており、ヘルシンキ宣言の内容、遺伝学的検査に関するガイドライン(遺伝医学関連学会等10学会および研究会、平成15年8月)、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(文部科学省、厚生労働省、経済産業省、平成13年4月1日施行)および疫学研究に関する倫理指針(同、平成14年7月1日施行)に準拠する。

C. 研究結果

遺伝子多型解析
アルツハイマー病およびレビー小体病患者の脳においてはBDNF遺伝子多型に有意な相関性は見られなかった。

D. 考察

種々のうつ病モデル動物の海馬領域ではBDNF遺伝子の発現が低下していること、またBDNFの低下は抗うつ薬投与で阻

の関連性についての解析を計画中である。

E. 健康危険情報
なし

F. 研究発表

(1) 論文発表

Fujishiro H, Umegaki H, Isojima D, Akatsu H, Iguchi A, Kosaka K. Depletion of cholinergic neurons in the nucleus of the medial septum and the vertical limb of the diagonal band in dementia with Lewy bodies. *Acta Neuropathol.* 111: 109-114, 2006.

Togo T, Isojima D, Akatsu H, Suzuki K, Uchikado H, Katsuse O, Iseki E, Kosaka K, Hirayasu Y. Clinical features of argyrophilic grain disease: a retrospective survey of cases with neuropsychiatric symptoms. *Am J Geriatr Psychiatry.* 13: 1083-1091, 2005.

Mitsuda N, Yamagata HD, Zhong W, Aoto M, Akatsu H, Uekawa N, Kamino K, Taguchi K, Yamamoto T, Maruyama M, Kosaka K, Takeda M, Kondo I, Miki T. A novel alternative splice variant of nicastrin and its implication in Alzheimer disease. *Life Sci.* in press.

Yamamoto R, Iseki E, Marui W, Togo T, Katsuse O, Kato M, Isojima D, Akatsu H, Kosaka K, Arai H. Non-uniformity in the regional pattern of Lewy

pathology in brains of dementia with Lewy bodies. *Neuropathology* 25: 188-194, 2005.

Zhong W, Yamagata HD, Taguchi K, Akatsu H, Kamino K, Yamamoto T, Kosaka K, Takeda M, Kondo I, Miki T. Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase is a novel risk gene for Alzheimer disease. *J Neurol Sci.* 238: 53-57, 2005.

Satoh K, Hata M, Shimizu T, Yokota H, Akatsu H, Yamamoto T, Kosaka K, Yamada T. Lib, transcriptionally induced in senile plaque-associated astrocytes, promotes glial migration through extracellular matrix. *Biochem Biophys Res Commun.* 335: 631-636, 2005.

Taguchi K, Yamagata HD, Zhong W, Kamino K, Akatsu H, Hata R, Yamamoto T, Kosaka K, Takeda M, Kondo I, Miki T. Identification of hippocampus-related candidate genes for Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 57: 585-588, 2005.

(2) 学会発表

赤津裕康, 磯島大輔, 桑野良三, 山本孝之, 小阪憲司 脳水腫と脳梗塞を併発し非特異的的老人斑を伴ったアルツハイマー病の1例 第46回日本神経病理学会総会学術研究会 2005年5月12~14日, 宇都宮

都甲崇, 勝瀬大海, 塩崎一昌, 井関栄三,

秋山治彦, 土谷邦秋, 磯島大輔, 赤津裕康, 鈴木京子, de Silva Rohan, Lees Andrew, 小阪憲司, 平安良男 4-repeat tauopathies における pretangles の検討 第46回日本神経病理学会総会学術研究会 2005年5月12~14日, 宇都宮

藤城弘樹, 梅垣宏行, 赤津裕康, 磯島大輔, 井口明久, 小阪憲司 レビー小体型痴呆における中隔核の免疫組織化学的検討 第46回日本神経病理学会総会学術研究会 2005年5月12~14日, 宇都宮

堀本佳彦, 松本光弘, 赤津裕康, 小阪憲司, 山本孝之, 小島章弘, 吉田眞理, 橋詰良夫 Machado-Joseph 病におけるMRI 所見と病理所見の対比 第46回日本神経病理学会総会学術研究会 2005年5月12~14日, 宇都宮

赤津裕康, 磯島大輔, 桑野良三, 山本孝之, 小阪憲司 脳水腫と脳梗塞を併発し非特異的老人斑を伴ったアルツハイマー病の1例 第46回日本神経病理学会総会学術研究会 2005年5月12~14日, 宇都宮

研究成果の刊行に関する一覧表

- 1) Nakai, S., Matsunaga, W., Isobe, K. and Shirokawa, T.
Age-dependent interactive changes in serotonergic and noradrenergic cortical
Axon terminals in F344 rats.
Neuroscience Research, in press.
- 2) Nakai, S., Matsunaga, W., Ishida, Y., Isobe, K. and Shirokawa, T.
Effects of BDNF infusion on the axon terminals of locus coeruleus neurons
of aging rats.
Neuroscience Research, in press.
- 3) Matsunaga, W., Isobe, K. and Shirokawa, T.
Involvement of neurotrophic factors in aging of noradrenergic innervations in
hippocampus and frontal cortex.
Neuroscience Research, in press.



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Neuroscience Research xxx (2006) xxx–xxx

**Neuroscience
Research**

www.elsevier.com/locate/neures

Age-dependent interactive changes in serotonergic and noradrenergic cortical axon terminals in F344 rats

Sadamu Nakai^{a,b}, Wataru Matsunaga^a, Kenichi Isobe^{a,b}, Tetsuya Shirokawa^{a,c,*}

^a Department of Basic Gerontology, National Center for Geriatrics and Gerontology, 36-3 Gengo, Morioka, Obu, Aichi 474-8522, Japan

^b Department of Immunology, Nagoya University Graduate School of Medicine, 65 Tsurumai-cho, Showa-ku, Nagoya, Aichi 466-8560, Japan

^c Department of Information Technology for Human Welfare, Faculty of Social and Information Sciences, Nihon Fukushi University, 26-2 Higashihaemi-cho, Handa, Aichi 475-0012, Japan

Received 27 September 2005; received in revised form 21 November 2005; accepted 9 December 2005

Abstract

In the frontal cortex of aging rats, we found an increase in sprouting of the noradrenergic (NA) axons originated from the locus coeruleus (LC). The serotonergic (5-HT) axons originating from the dorsal raphe (DR) share the same cortical area and their age-dependent changes and interactions with NA axons were still unclear. To compare quantitatively the extent of axonal sprouting of DR and LC neurons in the frontal cortex, we extracellularly recorded from both DR and LC neurons in the same animals and antidromically stimulated 32 cortical sites (a pair of stimulating electrodes was moved at 100- μ m intervals from 500 to 2000 μ m in depth). In addition, to examine the effects of degeneration of 5-HT axons on NA axons, and vice versa, we used specific neurotoxins for 5-HT (PCA) or NA (DSP-4) axons. We also used noradrenaline uptake inhibitor (maprotiline) to verify the effects of NA on degeneration of 5-HT axons. Results suggested that 5-HT axons sprouted between 15 and 17 months of age and noradrenaline accelerated the age-dependent change of 5-HT axons.

© 2005 Elsevier Ireland Ltd and the Japan Neuroscience Society. All rights reserved.

Keywords: Electrophysiology; Dorsal raphe; Locus coeruleus; Monoamine; Interaction; Aging

1. Introduction

In the rat frontal cortex, two ascending monoaminergic axons which originated from the brain stem innervate throughout the cortical layers (Fuxe et al., 1968; Morrison et al., 1978; Vertes, 1991). The serotonergic (5-hydroxytryptamine; 5-HT) axons are from the dorsal raphe (DR) nucleus, and the noradrenergic (NA) axons from the locus coeruleus (LC). These monoaminergic projections are involved in anxiety and depressed behavior, and their impairment is implicated in the mechanism of clinical depression (Mongeau et al., 1997; Beaufour et al., 1999; Cryan et al., 2004). Recently, the extent of 5-HT axonal sprouting has been evaluated in the prefrontal cortex of depressed patients who had committed suicide. Significant loss of 5-HT axons was found in deep layers of the patients' prefrontal cortex (Austin et al., 2002). This suggested that the involvement of cortical 5-HT axon in depression.

However, it is still unclear whether the reduction of cortical 5-HT innervations is the only cause of depression.

Antidepressant drugs are known to elicit their effects by increasing synaptic concentrations of 5-HT and/or NA (Frazer, 1997). Although the effects of these drugs are mainly due to an inhibition of uptake of released monoamines, the monoamine uptake inhibitors also induce regenerative sprouting of monoamine axons in the frontal cortex (Nakamura, 1990, 1991; Kitayama et al., 1994). This suggests that the therapeutic effects of antidepressants may be due to the sprouting of monoaminergic axons. Therefore, investigation of the possible interaction between 5-HT and NA axon terminals may well provide insight into the remediation of depression.

Sprouting of monoaminergic axons is a likely anti-aging mechanism to prevent loss of innervations which are concerned with attention, cognition and mood alterations in the terminal fields (Glennon, 1990; Harley, 1991; Van de Kar, 1991; Ishida et al., 2000, 2001a; Shirokawa et al., 2000a,b). Recently, we have reported that the axon terminals of LC neurons sprout in middle age, following the age-dependent loss of innervations in the frontal cortex and hippocampus (Ishida et al., 2000, 2001a;

* Corresponding author. Tel.: +81 569 20 0118; fax: +81 569 20 0127.

E-mail address: shiro@n-fukushi.ac.jp (T. Shirokawa).

Shirokawa et al., 2000a,b). Since concentration of NA was maintained in the frontal cortex in the aged rats (Ishida et al., 2001b), the increased sprouting of LC axons may compensate the loss of their innervation in the aged brain (Shirokawa et al., 2003). If this age-dependent sprouting simultaneously occurs in the axon terminals of DR-5-HT neurons during aging, interactions are plausible among monoaminergic axons.

We studied, therefore, the age-dependent changes in 5-HT and NA axon terminals in rat frontal cortex. In addition, to investigate possible interaction between the two monoaminergic axon terminals, we quantify the extent of axonal sprouting in the cortical layers using *in vivo* electrophysiological techniques to antidromically activate the axon terminals of individual DR and LC neurons. Moreover, maprotiline, a selective NA uptake inhibitor, *n*-(2-chloroethyl)-*n*-ethyl-2-bromobenzylamine hydrochloride (DSP-4) and DL-*p*-chloroamphetamine hydrochloride (PCA) are used to evaluate interaction between 5-HT and NA axon terminals in middle-aged rat. The results of the present study demonstrate an important role for NA in activation and/or maintaining of 5-HT axon terminals in normal aging rats.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Male F344/N rats ranging 3–24 months old were used. They were kept with a 12 h/12 h light/dark cycle, and had free access to food and water. All animal procedures complied with the National Institutes of Health guidelines and were approved by the Laboratory Animal Research Facilities Committee of National Center for Geriatrics and Gerontology.

2.2. Experimental procedures

Animals were anaesthetized with urethane (1.2 g/kg, *i.p.*) which was supplemented as necessary during these experiments. Lidocaine (4% xylocaine) was applied locally to all incisions. Rats were fixed in a stereotaxic apparatus. Rectal temperature was maintained at 36.5 °C by a heating pad (Bio Research Center Co., Japan). The electrocardiogram was monitored continuously during these experiments. Stimulating electrodes of the bipolar type consisted of the insulated stainless steel wires (diameter 80 μ m, tip separation 40 μ m). Electrical pulses of 0.5 ms duration with currents ranging from 0.1 to 5.0 mA were given to these stimulus sites, and the cycle of stimulation was 1.5 s. A pair of stimulating electrodes was moved up and down between 500 and 2000 μ m below the cortical surface with an interval of 100 μ m. Thirty-two cortical sites (16/track) were stimulated by antidromic activation of DR or LC cells. The stimulating current was adjusted to a value just sufficient to elicit an antidromic response to every stimulus. For each DR/LC neuron activated antidromically from the frontal cortex, the threshold currents were measured by varying the stimulating current in 0.01 mA steps (Fig. 1A). The threshold current was defined as the minimum stimulating current sufficient to elicit an antidromic response. The antidromic latency was also measured for individual DR/LC neurons. The electrical activities of DR and LC neurons were extracellularly recorded with a glass pipette microelectrode filled with 2 M NaCl. Electrode resistance ranged from 10 to 20 M Ω . Recording electrodes were introduced in the cerebellum, usually 0.2 mm from the midline and 2.4 mm posterior to lambda for DR neurons, and 1.2 mm from the midline and 3.0 mm posterior to lambda for LC neurons. Each electrode track was angled 16° anteriorly from the vertical for LC unit recording and 30° for DR unit recording, respectively. For each animal, we first recorded 10–12 antidromically driven units from the DR, and then recorded from the LC.

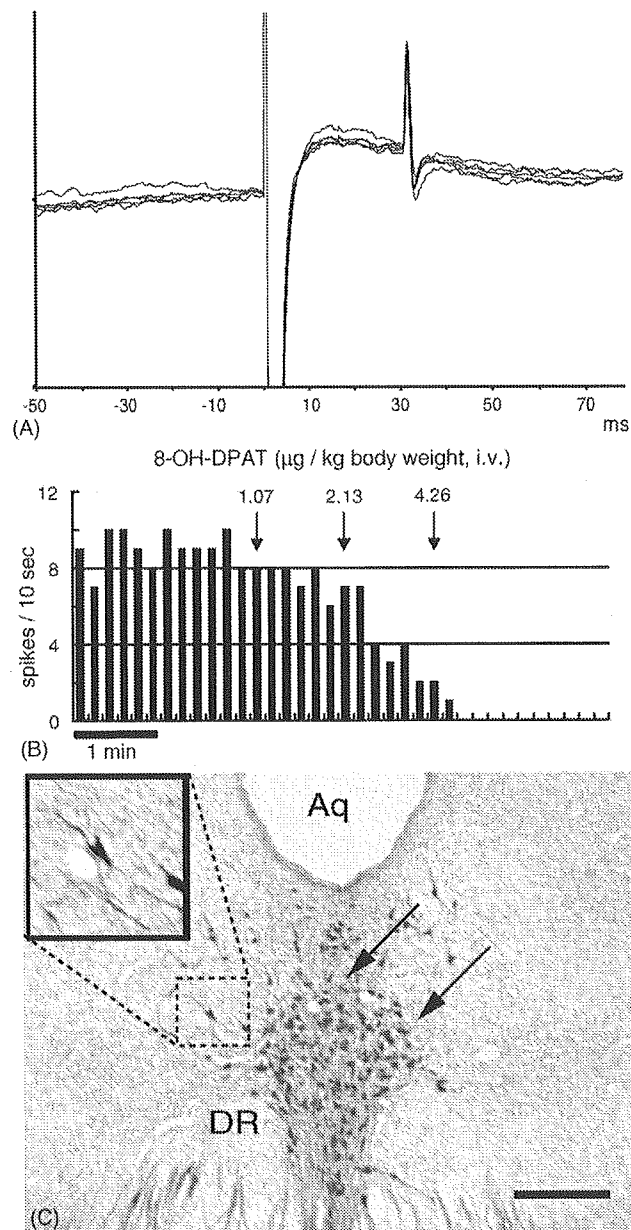


Fig. 1. (A) Antidromic responses of serotonergic neurons to electrical stimulation of FC. At a current of 2.05 mA, antidromic response with single antidromic latency was evoked at a latency of 30.9 ms in a 6-month-old rat. Five consecutive sweeps were superimposed in the non-collision trials. (B) The effect of intravenous administration of the 5-HT_{1A} receptor agonist, 8-OH-DPAT, on the spontaneous firing of a representative serotonergic neuron. After the recording of basic spontaneous activities for 2 min, 8-OH-DPAT was injected every minute (1.07, 2.13, and 4.26 μ g/kg *i.v.*). (C) Serotonin immunoreactivity in the DR. The part of an interrupted circle is shown at higher magnification. Arrows indicate serotonergic neurons. DR: dorsal raphe nucleus. Aq: aqueduct (bar = 100 μ m).

2.3. Confirmation of LC noradrenergic neuron

The LC noradrenergic neurons were identified according to the criteria used by several authors (Nakamura, 1977; Aston-Jones and Bloom, 1981; Ishida et al., 2000). Briefly, the LC neurons were identified by their characteristic wide spike duration (\approx 2 ms), slow and tonic spontaneous firing (0.5–6 Hz) and activation by tail pinches followed by a long-lasting suppression of firing (data not shown).

2.4. Confirmation of DR serotonergic neuron

The DR serotonergic neurons were identified according to the criteria used by several authors (Sawyer et al., 1985; Wang and Aghajanian, 1977). Briefly, the DR neurons were identified by (i) a regular spontaneous firing rate (0.1–3.0 spikes/s), (ii) a characteristic di- or triphasic extracellular waveform, and (iii) the antidromic responses with a long latency to the stimulation of neostriatal or medial forebrain bundle in some case. Finally, some neurons were confirmed as serotonergic by examining if the spontaneous firing was abolished by the injection of a selective 5-HT_{1A} auto-receptor agonist, 8-hydroxy-2 (di-*n*-propylamino)tetralin (8-OH-DPAT, Biomol, PA, 1.07, 2.13, and 4.26 μ g/kg, i.v.). After total inhibition of this spontaneous activity, electrical pulses were applied to check the existence of the neuron.

2.5. Drug treatments

DSP-4 (*n*-(2-chloroethyl)-*n*-ethyl-2-bromobenzylamine hydrochloride) and PCA (DL-*p*-chloroamphetamine hydrochloride) (Sigma–Aldrich, MO) were intraperitoneally injected into rats at the age of 15 months in doses of 50 mg/kg or 20 mg/kg. These solutions were dissolved in 1.0 ml isotonic saline, and prepared just prior to use. As a control, isotonic saline was intraperitoneally administered to rats. After 1 month of injections, the electrical activity of DR neurons and LC neurons was recorded (Fig. 3A).

After the 2-week DSP-4 treatment at the age of 15 months, the rats received maprotiline (Sigma–Aldrich, MO) dissolved in tap water via light-protected bottles for 1 week or 2–4 weeks, and solutions were renewed on alternate days. The concentration of maprotiline in the solution was controlled, ranging from 8 to 11 mg/kg/day, which is comparable with previously reported doses that inhibited NA reuptake (Garcha et al., 1985).

2.6. Immunohistochemistry

Dopamine- β -hydroxylase (DBH) immunohistochemistry was performed as follows. Rats were anesthetized with an overdose of urethane (3 g/kg, i.p.) and perfused through the ascending aorta with saline followed by 500 mL of chilled 0.1 M phosphate buffer (PB) containing 4% paraformaldehyde (pH 7.4). The brain of each rat was removed and postfixed overnight in 4% paraformaldehyde in 0.1 M PB and immersed in 30% sucrose in 0.1 M PB at 4 °C. The brain was sectioned in the coronal plane at 20- μ m thickness between the level from 1.75 to 2.25 mm anterior to bregma, which included the stimulation site in the frontal cortex, and the level from –7.04 to –9.30 mm posterior to bregma, which included the recording site in the dorsal raphe, by a CM1800 cryotome (Leica, Heerburg, Switzerland). Sections were pretreated with 1% H₂O₂ in PBS for 20 min at room temperature (RT), and 0.1% NaBH₄ in PBS for 5 min. After pretreatment, sections were incubated with MAB308 monoclonal anti-DBH antibody (Chemicon International, Inc., CA) diluted 1:4000 in PBS containing 0.3% Triton X-100 (PBST) and 1% normal horse serum for 2 days at 4 °C. After incubation with the primary antibody, sections were incubated with biotinylated anti-mouse IgG made in horse (dilution 1:400 in PBST, Vector Labs) for 2 h at RT, and then incubated with ABC elite reagent (dilution 1:200 in PBST, Vector Labs) for 2 h at RT. Visualization was performed with 0.02% 3,3'-diaminobenzidine and 0.01% H₂O₂ in 0.05 M Tris–HCl buffer (pH 7.4). Sections were mounted on gelatin-coated glass slides, dehydrated and coverslipped out of xylene. Staining for 5-HT was conducted successively using a similar procedure for DBH. Briefly, non-specific binding was blocked with the 1% normal goat serum (Chemicon International, Inc., CA) in PBST for 3 days at RT. Endogenous peroxidase activity was blocked as described above, then the sections were incubated with polyclonal antibody against 5-HT (1:100,000) (Diasorin, MN) in PBST containing at 37 °C for 3 days. This was followed by incubations with biotinylated anti-rabbit IgG(H+L) (1:400) (Vector Labs, CA) in PBST at RT for 2 h, and then with ABC reagent (1:200, ABC Elite, Vector Labs, CA) at RT for 2 h. Visualization was performed with 0.02% 3,3'-diaminobenzidine and 0.01% H₂O₂ in 0.05 M Tris–HCl buffer (pH 7.4). Sections were mounted on gelatin-coated glass slides, dehydrated and coverslipped out of xylene.

2.7. Sites/cell and P-index

We employed two electrophysiological measurements to quantify the extent of axonal sprouting of DR/LC neurons: (i) the site activated antidromically for each DR/LC neuron through the cortical layers in the frontal cortex (*sites/cell*: number of sites activated antidromically for individual DR/LC neurons); and (ii) the percentage of DR/LC neurons activated antidromically from the frontal cortex for each animal (*P*-index: number of DR/LC neurons with antidromic response/number of recorded DR/LC neurons) (Nakamura et al., 1989; Ishida et al., 2000).

2.8. Data analysis

Results are expressed as mean \pm S.E.M. Statistical analysis of differences between groups was performed using post hoc Games-Howell. Significance levels were set at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Effects of 8-OH-DPAT on spontaneous activity of DR serotonergic neuron

Seven antidromically activated neurons, presumed to be serotonergic DR neurons on the basis of their waveform and spontaneous activity, were checked for a dose-dependent inhibition of the spontaneous firing by intravenous injection of 8-OH-DPAT. Fig. 1B shows a representative putative serotonergic neuron. Every presumed serotonergic neuron was inhibited by 8-OH-DPAT dose-dependently. After each injection of 8-OH-DPAT, the existence of neurons was checked by applying electrical pulses (data not shown). Fig. 1C shows the recording site of DR serotonergic neurons.

3.2. Effects of aging on cortical axon terminals of DR and LC neurons

Fig. 2A shows the age-dependent changes in cortical projections of DR neurons, which were antidromically activated through the cortical layers at least at one site. To quantify the changes in the extent of axonal sprouting for individual DR neurons, we examined the number of sites activated antidromically (maximum value: 32 sites/cell). No significant change was observed between 3 months (11.3 ± 0.8 sites/cell) and 15 months of age (12.1 ± 0.9 sites/cell), but the number of activated sites significantly increased at 17 months of age (Fig. 2A; 16.1 ± 1.1 sites/cell, $p < 0.05$). This increase returned to the initial level at 24 months of age (12.1 ± 1.0 sites/cell).

Fig. 2B shows the age-dependent changes in cortical projections of LC neurons, which were antidromically activated through the cortical layers. The extent of LC axonal sprouting did not show any significant change between 3 and 11 months of age (13.7 ± 0.8 and 15.5 ± 1.0 sites/cell, respectively, $p > 0.05$). The number of activated sites decreased at 15 months of age (12.2 ± 1.1 sites/cell), and then the sites returned to the initial level at 17 months of age (14.7 ± 1.3 sites/cell). The increased sites/cell gradually decreased thereafter and reached the lowest level at 24 months of age (9.7 ± 0.8 sites/cell).

We employed another electrophysiological measurement, the *P*-index (Nakamura et al., 1989; Ishida et al., 2000), to quantify the amount of cortical projections from each nucleus,

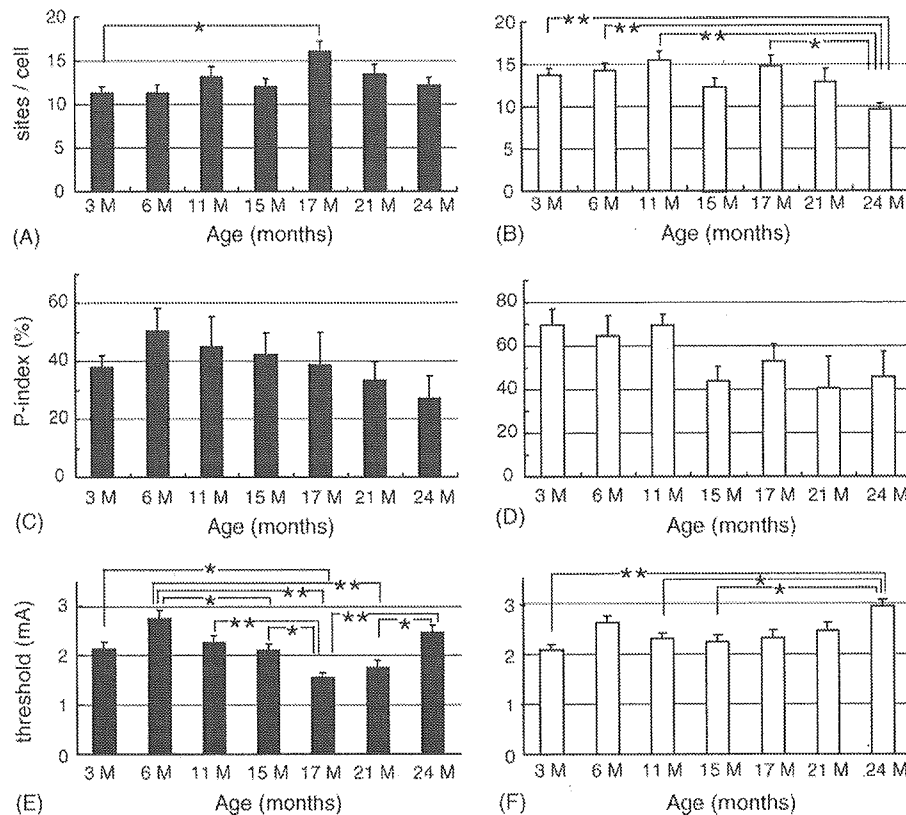


Fig. 2. The effect of aging on the projections from DR (A) and LC (B) to frontal cortex. (A) The extent of 5-HT axonal sprouting represented by the number of stimulation sites evoking antidromic responses in DR neurons was plotted against age in months. The extent of 5-HT axonal sprouting in the frontal cortex critically increased between 15 and 17 months of age, and gradually declined thereafter. The total number of DR neurons recorded for each age group is as follows: 3 months of age, $n = 50$; 6 months, $n = 51$; 11 months, $n = 51$; 15 months, $n = 57$; 17 months, $n = 38$; 21 months, $n = 40$; 24 months, $n = 43$. (B) The extent of NA axonal sprouting in the frontal cortex declined between 11 and 15 months of age. The extent of axonal sprouting increased again between 15 and 17 months of age, and gradually declined thereafter. Vertical axis shows the antidromically activated numbers of sites of each neuron (maximum value: 32 sites/cell) from the electrical stimulation of frontal cortex. The total number of LC neurons recorded for each group is as follows: 3 months, $n = 60$; 6 months, $n = 51$; 11 months, $n = 51$; 15 months, $n = 40$; 17 months, $n = 34$; 21 months, $n = 34$; 24 months, $n = 49$. (C) Age-dependent changes in P -indices (number of DR neurons with antidromic latencies/number of recorded DR neurons) in the frontal cortex. The P -indices in DR neurons increased between 3 and 6 months of age, and gradually declined thereafter. $n = 5$ –6 rats per group of age. (D) Age-dependent changes in P -indices (number of LC neurons with antidromic latencies/number of recorded LC neurons) in the frontal cortex. The P -indices in LC neurons decreased between 11 and 15 months of age, and did not change thereafter. $n = 4$ –6 rats per group of age. (E) Age-dependent changes in threshold of axon terminals of DR neurons in frontal cortex. The threshold currents of DR neurons in frontal cortex showed the lowest value at 17 months of age (3 months, $n = 80$; 6 months, $n = 90$; 11 months, $n = 84$; 15 months, $n = 98$; 17 months, $n = 80$; 21 months, $n = 68$; 24 months, $n = 79$). (F) Age-dependent changes in threshold of axon terminals of LC neurons in the frontal cortex. The threshold currents of LC neurons in frontal cortex showed the lowest value at 15 months of age, and increased thereafter (3 months, $n = 118$; 6 months, $n = 106$; 11 months, $n = 110$; 15 months, $n = 75$; 17 months, $n = 72$; 21 months, $n = 67$; 24 months, $n = 78$). Data are means \pm S.E.M. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; post hoc Games-Howell.

LC and DR, for individual animals. As shown in Fig. 2C, the mean P -indices for DR projections peaked at 6 months of age ($50.5 \pm 7.7\%$), and then gradually decreased until 24 months of age ($27.0 \pm 8.0\%$). In contrast, the mean P -indices for LC projections indicated different aging pattern as shown in Fig. 2D. The P -indices were maintained until 11 months of age ($69.4 \pm 4.7\%$). They rapidly decreased at 15 months of age ($44.0 \pm 6.5\%$), and then did not return to the initial level thereafter. Thus, we obtained two different types of age-dependent changes for DR and LC projections as follows: (i) the axon terminal arborization of individual DR neurons, evaluated by sites/cell, showed a marked increase at middle age (Fig. 2A), while the amount of DR projections for each animal, assessed by the P -index, indicated a gradual decrease from adult to aged (Fig. 2C); and (ii) the axon terminal arborization of individual LC neurons showed a decrease/increase/decrease cycle from

middle-age to aged (Fig. 2B), while the amount of LC projections indicated a critical decrease at middle age (Fig. 2D). Focusing on the changes in DR/LC projections in middle age, we observed the following sequence of changes: (i) a decrease in LC projections at 15 months of age, (ii) an increase in LC projections at 17 months of age, and (iii) an increase in DR projections at 17 months of age.

To investigate age-dependent changes in excitability of axon terminals of individual DR neurons, we focused on the mean threshold currents for antidromic activation of DR neurons during aging, as shown in Fig. 2E. The threshold current for antidromic activation of axon depends on the distance between stimulating electrodes and activated axons as well as axon excitability (Nakamura et al., 1981; Ishida et al., 2000). If axonal sprouting increases at the stimulus site, the distance between the stimulating electrodes and activated axons is