

200730032A

厚生労働科学研究 研究費補助金  
こころの健康科学研究事業

ヒトを対象にした精神疾患の生物学的病態解明に関する研究  
(課題番号 H18-こころ-一般-010)

感情障害の脳器質的発症脆弱性の神経科学的病態の解明  
およびその機能修復と一次予防に関する研究

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 三國 雅彦  
(群馬大学大学院医学系研究科脳神経精神行動学分野)

平成20年(2008)年3月

# 目 次

|                                     |    |
|-------------------------------------|----|
| I. 総括研究報告書                          |    |
| 主任研究者 三國 雅彦                         | 1  |
| II. 分担研究報告書                         |    |
| うつ病の脳器質的発症脆弱性の物質病態機序並びに             | 7  |
| その修復機序の解明とうつ病発症一次予防の確立              |    |
| 三國 雅彦                               |    |
| うつ病における認知障害及び認知症への進展に関わる            | 11 |
| 神経生物学的基盤解明のための研究                    |    |
| 新井 平伊                               |    |
| うつ病死後脳解析からみた若年発症と高齢初発うつ病発症脆弱性の      | 15 |
| 神経病理学的研究                            |    |
| 池田 研二                               |    |
| 気分障害患者における遺伝子発現調節異常と高齢初発うつ病の脳画像的解析と | 18 |
| 薬物治療反応性に関する研究                       |    |
| 渡辺 義文                               |    |
| 感情障害における膜受容体から細胞骨格へのシグナル伝達機能に       | 21 |
| 関する脳科学的研究                           |    |
| 白尾 智明                               |    |
| 大脳皮質における GABA 神経亜型、錐体細胞の機能的結合に関する   | 25 |
| 神経生理学的研究                            |    |
| 川口 泰雄                               |    |
| 躁うつ病の動物病態モデルの作成と新規気分安定薬のスクリーニング法の確立 | 28 |
| 加藤 忠史                               |    |
| IV. 業績一覧                            | 31 |
| V. 研究成果の別刷                          | 35 |

# I. 総括研究報告書

総括研究報告書

ヒトを対象にした精神疾患の生物学的病態解明に関する研究

(H18-こころ-一般-010)

感情障害の脳器質的発症脆弱性と認知機能障害の神経科学的病態の解明および  
その機能修復と一次予防に関する研究

主任研究者 三國 雅彦

群馬大学大学院医学系研究科脳神経精神行動学分野 教授

研究要旨：

本研究では神経の発生・移動・分化・細胞死並びに動脈硬化・血管周囲の炎症に関連するうつ病の微細な脳器質性発症脆弱性の実態の解明と修復の可能性を探求し、根治的な治療法を確立することを目的としている。躁うつ病などの感情障害はその発症脆弱性を有する個人に種々のライフイベントが作用することによって発症すると考えられる。そこでわれわれは感情障害の初発年齢のピークが 20 歳代と 50 歳代にあることに着目して、うつ状態に依存的な機能的変化を示す前頭前野に、神経発達期の細胞構築異常並びに退行期の微細な脳血管障害という別々の微小な器質異常が存在することを報告してきた。また、うつ病相期には、前頭前野の神経機能異常、辺縁系の神経機能異常、視床下部・下垂体・副腎皮質（HPA）系のフィードバック機能の低下などの病態が複雑の絡み合って出現すること、神経心理学的検査で遂行機能や記憶機能の異常が捉えられること、寛解期にもこれらの一部が残存することを明らかにしてきたが、上記の微細な器質因がどのようにこれらの病態の形成に関与しているかの解明も併せて検討している。これらの成果を踏まえて分担研究を推進し、以下のような成果を得た。

- (1) 中高年初発うつ病で MRI の T2 強調画像での白質高信号陽性、T2\* 画像でのヘモジデリン沈着陰性の抗うつ薬療法抵抗性症例につき、抗血小板薬シロスタゾールを追加すると、速やかな臨床症状の改善と SPECT での局所脳血流の改善が得られることを明らかにして、ケースレポートするとともに、新たなオーギュメンテーション療法としての可能性を 7 症例で検討した成績についても論文化した。その他の抗血小板薬についての検討を開始した。
- (2) 若年初発の双極性では 5 $\mu$ m 以上の比較的大型のカルレチニン陽性 GABA 神経細胞が皮質第二層で有意に増加、カルビンジン陽性 GABA 神経細胞は減少傾向を示すが、統合失調症ではいずれも有意に低下していることを論文化した。また、予備的ではあるが、若年初発の双極性ではペプチド陽性 GABA 神経細胞には変化がないことを明らかにした。
- (3) 双極性、単極性の感情障害リンパ球におけるグルコルチコイド受容体（GR）mRNA の発現が素因的に低下していることを報告してきたが、GR により発現制御を受けている、細胞接着因子 NCAM mRNA の発現量が抑うつ状態の双極性群において低下、LI mRNA の発現量は増加しており、いずれも状態依存的変化であることを明らかにした。また、選択的スプライシングに重要な役割を果たしている SRp20 mRNA の発現が双極性のうつ状態でも寛解状態でも増加していること、単極性では健常者と有意差はない

ことを明らかにした。

- (4) 視床下部に発現し、グルココルチコイドで発現調節をうける遺伝子の検索を網羅的に実施し、コルチコトロピン遊離促進ホルモンなどの分泌に関与する遺伝子として *sgk*、*bcl6*、*pdk4* に絞込むことができた。
- (5) Stroop test の成績は寛解期のうつ病患者で健常者と比較して若年群、高齢群ともに有意に低下していること、Verbal Fluency Test の成績は高齢うつ病でのみ低下し、若年発症では健常対照と差がないことを明らかにした。
- (6) ミトコンドリア遺伝子変異を加速させたマウスの脳内から単離ミトコンドリアではカルシウム取り込みが亢進していること、その原因としてシクロフィリンDの低下が関与していることを明らかにしたが、双極性感情障害死後脳でシクロフィリンDの低下を明らかにした。
- (7) 成熟脳の側脳室下帯や海馬歯状回で新生し、移動中の神経細胞はその細胞体に胎児型ドレブリンを発現しながら移動し、その発現が消失すると移動を停止することを免疫組織化学的に証明して報告した。
- (8) 前頭葉皮質の錐体細胞への視床からの興奮性入力の一部が GABA 神経亜型からの入力を選択的に抑制されること、アセチルコリンが錐体細胞サブタイプの出力を特異的に抑えることを明らかにした。

#### 分担研究者

- 三國 雅彦 (群馬大学大学院医学系研究科脳神経精神行動学分野教授)
- 新井 平伊 (順天堂大学医学部精神医学教室教授)
- 池田 研二 (慈恵病院医師・慈恵精神医学研究所研究員)
- 渡辺 義文 (山口大学医学部高次神経科学講座教授)
- 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)
- 川口 泰雄 (自然科学研究機構・生理学研究所大脳神経回路論研究部門教授)
- 加藤 忠史 (理化学研究所脳科学総合研究センター精神疾患動態研究チームリーダー)

#### 研究目的、研究経過、背景

平成 16 年 6 月に閣議決定された健康寿命延長 10 ヶ年計画達成の有力な戦略の一つがうつ病の早期発見と根治的治療、できれば発症予防であろうと考えて、本研究を提案した。この計画ではがん、脳血管障害、心筋梗塞、糖尿病の発症や死亡を減少させる戦略が掲げられているが、がんや心筋梗塞、糖尿病などに罹患後にうつ病が併存すると、QOL や ADL が著しく低下し、まさしく健康寿命を損なうことになるからである。

うつ病の初発年齢は 20 歳代と 50 歳代にピ

ークがあり、若年発症例では遺伝負因の保有率が比較的高く、躁病相を伴うことがあり、性差がないが、中高年初発例では生活習慣病の保有頻度が高く、躁病相を伴うことは稀であり、女性に多いという特徴が知られているので、若年初発と中高年初発に分けて脳機能画像解析や死後脳解析を行ってきた。うつ状態に依存的な変化を示す前頭前野 (BA9 野) の皮質第二層に神経発達期の障害が原因と考えられる細胞構築異常が認められ、GABA 神経亜型についての詳細な検討がなされている。

一方、退行期に初発するうつ病の症例ではその発症までの様々なストレス性刺激に曝されていても発症しなかったことになるので、神経発達障害と関連する発症脆弱性因子の関与よりも、むしろ中高年になって生じる発症脆弱性の可能性がある。これまでの中高年初発の感情障害死後脳の解析では前頭前野深部白質の細動脈硬化や細動脈周囲でのマクロファージや活性化ミクログリアの出現が観察され、細動脈硬化や炎症反応が発症脆弱性である可能性を明らかにしてきた。

さらに、ストレス負荷で活性化される視床下部-下垂体-副腎皮質（HPA）系に対するフィードバック機能低下に関与する可能性のあるグルココルチコイド受容体（GR）の mRNA の発現が末梢指標ながら素因的に低下していることも明らかにし、その異常が選択的スプライシングの異常と仮定して、SRタンパク質に注目し、気分障害患者における発現異常を明らかにした。一方、躁うつ病で推定されたミトコンドリア遺伝子の異常に類似したトランスジェニック動物を作成し、その病態から躁うつ病死後脳でシクロフィリン D の低下を明らかにした。したがって、これらの微細な器質的異常や遺伝子発現異常は発症前から存在し、健常者の一部にも存在している可能性があり、うつ病の発症脆弱性としては初発年齢、双極性か単極性かなどによって異なる要因が作用していることになる。

これらの器質的要因をいかに修復するか、予防に結びつけるかが大きな関心であり、抗血小板薬のオーギュメンテーション療法の試みや新生神経細胞による修復の可能性、皮質内の神経ネットワークに対する調節機能の可能性についても研究を推進しており、以下のような成果を得た。

（倫理面への配慮）研究に供された剖検脳は厚労省指針の B 群試料に相当する。東京都精神医学総合研究所、都立松沢病院、群馬大学

医学部の倫理委員会の承認を得たプロトコールにしたがって、情報管理者による匿名化操作を経て、解析した。その他の臨床研究もそれぞれの施設の倫理委員会や臨床試験委員会の承認を得たプロトコールにしたがって研究した。

### 抗うつ薬療法抵抗性の中高年発症うつ病に対する抗血小板薬を用いた抗うつ薬強化療法

MRIのT2強調画像での白質高信号陽性、T2\*画像でのヘモジデリン沈着陰性の中高年初発うつ病で抗うつ療法に抵抗性の症例につき、最低二週間以上抗うつ薬療法を固定した後、抗血小板薬シロスタゾールを50~100mg（可能であれば200mgまで）追加し、抗うつ効果を強化できるか、否かを研究班の共通プロトコールとして検討を開始した。

三國は上記の基準に合致する治療抵抗性中高年初発うつ病に対しシロスタゾールを50mg追加投与して、5週間後にはハミルトンうつ病尺度が改善、SPECT測定での平均局所脳血流量も増加した症例について報告した。

一方、新井は多発脳梗塞を有する老年期うつ病も含む7症例に対し、シロスタゾールをSSRIに併用投与して、抗うつ効果の強化が5症例に認められたことを報告した。このようにMRIにて微細な所見を有する高齢うつ病症例に対する抗うつ効果強化療法が本邦から初めて開発されたことは今後の高齢者うつ病対策にとってきわめて有用となるといえる。

### 感情障害の認知機能評価

感情障害には微細な脳血管障害や神経細胞構築異常などの器質的異常が存在すること及び認知症に移行する症例が稀ならず存在することから、感情障害における認知機能を神経心理学的に評価することがきわめて重要となっている。

新井はHDRSが7点以下となってほぼ寛解状態となったうつ病患者を対象に遂行機能

や記憶機能を測定し、脳器質性病変との関連性を年齢群別に調査した。その結果、Stroop test の成績が健常者と比較して寛解期となったうつ病患者でも若年群、高齢群ともに有意に低下していたが、近年の脳機能画像研究ではうつ病が寛解した後でも前頭前野や帯状回の機能異常が残存する場合があることと合わせて考えると興味深い。一方、語流暢性課題の成績は寛解期の高齢うつ病患者でのみ低下し、健常群と若年群では有意差がなく、高齢うつ病の成績には白質の血管病変の有無が影響を与えることが示された。寛解にある高齢うつ病では前頭葉の遂行機能の低下が持続し、白質の血管性変化が関与している可能性を示唆する興味深い成果といえる。

#### 感情障害発症脆弱性に関する死後脳および末梢指標の解析研究

退行期～高齢期のうつ病 (late-life depression: LLD) は疾病論的には、1) post-stroke depression (PSD) のように大きな動脈の粥状硬化に起因する粗大な脳梗塞で神経学的な臨床症状伴うつ病、2) MRI で見出される細動脈の微小脳梗塞で神経学的には臨床症状を呈していない状態であるうつ病 (LLD I 群)、3) MRI でも異常所見のない LLD II 群の三群に分けることができる。

池田は感情障害治療中に病死した方の死後脳と年齢・性をマッチさせた正常対照脳における細胞構築学的、組織化学的比較解析を進め、細動脈の動脈硬化などについて検討し、脳血管性病変を伴わない LLD II 群は正常対照群に較べて、細動脈の動脈硬化がないが、大脳白質のマクローファージの増加やミクログリアの活性化という形での異常が認められることを明らかにし、これに対して、脳血管性病変を伴う LLD I 群の血管壁は LLD II 群、対照群のいずれに対しても有意に肥厚し、細動脈硬化の存在を証明した。しかし、死線期の炎症や虚血・低酸素症の影響を排除してミクログリア活性化、オリゴデンドログリア

出現の有無を免疫組織化学的に厳密に検討するためには死後脳標本の処理法を検討する必要がある。

今年度は主として海外脳バンクから提供を受けたパラフォルムアルデヒド固定凍結浮遊病理標本セットを用いて、脳血管内皮の炎症性活性化、血管内～周囲の白血球接着～浸潤、さらにミクログリア総数などについて、組織定量的に検討したが、有意差がなかった。しかし、診断基準を満たしてはいないものの、アルツハイマー病様老人性変化を伴う症例が多く含まれており、確定的な所見は得られていない。

三國は躁うつ病症例、対照として統合失調症症例、ならびに精神疾患罹患歴のない正常対照症例の左前頭前野 (BA9 野) について、カルシウム結合タンパク質陽性の GABA 神経を検索し、解析ソフト Image J を用いて細胞数、サイズを計測した。その結果、双極性感情障害の皮質第二層では 5 $\mu$ m 以上の比較的大型のカルレチニン陽性 GABA 神経細胞が正常対照に比して有意に増加、カルビンジン陽性 GABA 細胞は減少傾向を示すが、統合失調症ではいずれも有意に低下していた。しかも予備的研究ではあるが、ペプチド陽性 GABA 神経細胞は双極性と正常対照との間に有意差がなく、したがって、前頭前野皮質第二層の 5 $\mu$ m 以上の比較的大型のカルレチニン陽性 GABA 神経細胞数の異常が双極性感情障害と統合失調症とを区別する指標になるという興味深い結果を得た。

一方、中高年初発のうつ病では細動脈硬化の無い症例でもミクログリアの活性化が認められたということなので、ミクログリアに存在するインドールアミン・ダイ・オキシゲナーゼ (IDO) の活性化によってトリプトファンがキヌレニン回路に大量に使われ、セロトニン合成が低下する病態生理を考えて、IDO 陽性細胞の検索を開始したが、ミクログリアだけでなく、神経細胞にも陽性細胞があり、他のキヌレニン回路に関わる酵素を用い

た、さらに詳細な検討が必要であることが明らかとなった。

また、HPA系の機能亢進の分子機序を明らかにする目的で、視床下部に発現し、グルココルチコイドで発現調節をうける遺伝子の検索を網羅的に実施し、コルチコトロピン遊離促進ホルモンなどの分泌に関与する遺伝子として、sgk、bcl6、pdk4に絞込むことができた。

渡辺はグルココルチコイド受容体 (GR) の  $\alpha$  と  $\beta$  の isoform の発現比率を、ヒトリンパ球を用いて検討し、未服薬の感情障害では  $\alpha$  isoform の発現量が低下していること、この変化はうつ状態の改善とは相関せず、第一度親族においても有意な低下が認められ、素因的な指標であることを明確にした。そこで、GRにより発現制御を受けることが示されている、神経可塑性や神経細胞の形態保持に対して必須の役割を果たす細胞接着因子 NCAM、L1、cadherin などの mRNA 発現量を解析した。興味深いことに、抑うつ状態の双極性群において NCAM mRNA の発現量低下、L1 mRNA の発現量増加を認め、いずれも状態依存的変化であることを突き止めた。

一方、GR の  $\alpha$  isoform の発現量低下を起こす機構として選択的なスプライシングの異常によることが推測されるので、スプライシング制御因子群発現量の検討という極めて先端的な研究に取り組んでいる。セリン・アルギニンという繰り返し配列を持つ一群の RNA 結合蛋白で、選択的スプライシングにおいてもスプライス部位の選択やスプライシングの活性化にかかわるなど重要な役割を果たしている SR タンパク質に注目し、気分障害患者における選択的スプライシング異常の可能性を検討するため、SR protein mRNA 発現量を検討し、単極性では健常者と有意差はなかったが、双極性のうつ状態でも寛解状態でも SRp20 mRNA の発現が増加していた。GR の素因的な異常とうつ病態形成の分子機序に関わる大変興味深い研究で、そ

の発展が期待される。

#### 器質的変化を修復するための基礎的研究

白尾は神経の移動・分化に関連するうつ病の器質的発症脆弱性の病態生理の解明とその修復の可能性を動物や細胞レベルで探索している。ドレブリン A の特異的配列に対する抗体と、ドレブリン A と E に対する抗体とを組み合わせる方法を開発し、ラット成熟脳の側脳室下帯、海馬歯状回や梨状葉の移動中の神経新生細胞を染め分けることに成功して報告した。用いられた二種類のドレブリン抗体 (M2F6 と DAS2) はラットドレブリンとヒトドレブリンの共通エピトープを認識するので、開発した移動神経細胞同定法によってうつ病における神経細胞移動の実態を明らかにすることができる可能性がある。

川口は大脳皮質局所回路の入出力がどのように GABA 細胞によって制御されているかを明らかにする研究に従事し、ラット前頭皮質の GABA 性非錐体細胞に発現しているペプチドやカルシウム結合タンパク質を同定するとともに、スパインの分布を計測して、シナプスの結合の規則性の解明を行ってきた。前頭葉皮質の錐体細胞の出力が、軸索初節部にシナプスを作る GABA 細胞によって抑制されることは知られていたが、この研究によって、錐体細胞への視床からの興奮性入力の一部がいくつかの GABA サブタイプからの入力で選択的に抑制されること、アセチルコリンが錐体細胞サブタイプの出力を特異的に抑えることを明らかにした。皮質内部回路の入出力部に、GABA やアセチルコリンによる選択的制御がかかっているという発見は感情障害の発症脆弱性と関連すると考えられる GABA 神経亜型の分布障害の機能修復に欠かせない知見を提供している。

加藤はミトコンドリア遺伝子複製酵素に一塩基変異を導入し、校正活性を失わせた変異体を作製し、ミトコンドリア遺伝子変異を加速させたマウスを作成することに成功し、

行動科学的分析や GTP 結合タンパク質を介するカルシウムシグナリングの低下所見から躁うつ病の遺伝的モデルとなる可能性があることを明らかにしてきた。しかもこのモデルの単離ミトコンドリアではカルシウム取り込みが亢進していること、その原因としてシクロフィリン D の低下が関与していることを明らかにしてきた。

今年の成果として、双極性感情障害死後脳でシクロフィリン D の低下を明らかにした。その機能異常を修復する薬物の開発が大いに期待されている。

## Ⅱ. 分担研究報告書

感情障害の発症脆弱性の分子基盤と病態形成機序の解明に関する研究

分担研究者 三國雅彦

群馬大学大学院医学系研究科脳神経精神行動学分野 教授

研究要旨：

躁うつ病などの感情障害について若年初発と中高年初発に分けて脳機能画像解析、死後脳解析を行い、前頭前野の神経発達期の細胞構築異常については GABA 神経亜型の分布、退行期の微細な脳血管障害に関してはインドールアミン・ダイ・オキシゲナーゼ (IDO) の発現陽性細胞の分布について検索し、以下のような成果を得た。

- (1) 若年初発の双極性障害では 50 $\mu$ m 以上の比較的大型のカルレチニン陽性 GABA 神経細胞が皮質第二層で有意に増加、カルビンジン陽性 GABA 神経細胞は減少傾向を示すのに、統合失調症ではいずれも有意に低下していることを明らかにして報告した。予備的には感情障害死後脳ではペプチド陽性 GABA 神経亜型の分布には差が認められなかった。
- (2) 中高年初発うつ病と若年初発の双極性障害死後脳について、抗 IDO 抗体を用いて免疫組織化学的に検索を開始したが、マイクログリアだけでなく、神経細胞にも陽性細胞があり、他のキヌレニン回路に関わる酵素を用いた詳細な検討が必要であることが明らかとなった。
- (3) 中高年初発うつ病で MRI の T2 強調画像での白質高信号陽性、T2\* 画像でのヘモジデリン沈着陰性の抗うつ薬療法抵抗性症例につき、抗血小板薬シロスタゾールを追加すると、速やかな臨床症状の改善と SPECT での局所脳血流の改善が得られることを明らかにして報告し、他の抗血小板薬にも同様の効果がある症例を確認した。
- (4) 視床下部-下垂体-副腎皮質系に関するうつ病の発症脆弱性の分子機序を明らかにするため、デキサメサゾンで発現が変化し、コルチコトロピン遊離促進ホルモンなどの分泌に関与する遺伝子をマイクロアレーと独自に開発したカスタムアレーで網羅的に検索し、シグナル伝達因子 sgk、転写因子 bcl6、糖代謝酵素 pdk4 を検出した。

A. 研究目的、研究経過、背景

われわれは、うつ状態に依存的な変化を示す前頭前野に神経発達期の細胞構築異常や退行期の微細な脳血管障害という別々の発症脆弱性が存在することを明らかにしてきた。そこで、神経発達期の細胞構築異常を明らかにするため GABA 神経亜型の分布の異

常の有無を検索し、退行期の微細な脳血管障害については細動脈硬化の無い症例でもマイクログリアの活性化が認められたので、マイクログリアに存在するインドールアミン・ダイ・オキシゲナーゼ (IDO) の活性化によってトリプトファンがキヌレニン回路に使われ、セロトニン合成が低下する病態生理を考

えて、IDO陽性細胞の検索を開始した。また、視床下部-下垂体-副腎皮質（HPA）系のフィードバック機能低下がうつ病態の一部を形成しているため、グルココルチコイド受容体刺激で増減する遺伝子の同定を開始した。以下に今年度の研究成果や研究経過を略述する。

## B. 研究方法

### （1）抗血小板薬による抗うつ薬の抗うつ効果強化療法

MRIのT2強調画像での白質高信号陽性、T2\*画像でのヘモジデリン沈着陰性の中高年初発うつ病で抗うつ療法に抵抗性の症例につき、最低二週間以上抗うつ薬療法を固定した後、抗血小板薬シロスタゾールを50～200mg追加して、抗うつ効果を強化できるかを追加の症例で検討することと、他の抗血小板薬にも同様の効果があるかについて検討した。

### （2）死後脳の解析研究

東京都精神医学総合研究所に保存されている剖検脳のなかから、自殺ではなく身体疾患にて死亡した精神疾患患者のうち、躁うつ病症例、中高年初発うつ病症例、対照として統合失調症症例、ならびに精神疾患罹患歴のない正常対照の左前頭前野（BA9野）について、4%パラホルム溶液にて固定し、クリオスタットで薄切切片を作成した。GABA神経の亜型として、カルビンジンやカルレチニンなどのカルシウム結合タンパク質陽性GABA神経とNeuropeptide(NPY)やcholecystinin (CCK)などのペプチド陽性GABA神経とが知られている。一次抗体としてカルビンジン（1:100, Sigma）、カルレチニン（1:1000, Sigma）、パルブアルブミン（1:800, Abcam）の抗体を購入し、通常のごとく染色し、解析ソフトImage Jを用いて細胞数、サイズを計測した。

また、抗IDO抗体は国立長寿科学研究センターの滝川博史博士が作成したものであり、共同

研究として贈与頂いた。

### （3）視床下部に発現し、コルチコトロピン遊離促進ホルモン（CRH）などのペプチドの合成・分泌に関わる遺伝子であるとともにグルココルチコイド反応性の遺伝子の同定

ラット視床下部 mRNA ライブラリーから11092のクローンの塩基配列をすべて明らかにし、そのプロファイリングの結果、神経ペプチドの合成・分泌に関わる609個の遺伝子に絞り込み、さらにグルココルチコイド受容体（GR）の結合部位（GRE）をもつ遺伝子を絞り込むため、GREとしての配列をTTGAACAGTCTGTACTとして検索した。また、Genechip（Affymetrix）と、上述の独自に開発した視床下部に発現する遺伝子を網羅したプロファイリングのうちペプチド合成・分泌に関わる遺伝子でマイクロアレイからもれている遺伝子について作成したカスタムアレイを用いて、デキサメサゾン投与（2mg/kg i.p.、2時間後）で発現の増減する遺伝子を検索した。

### （倫理面への配慮）

研究に供された剖検脳は東京都精神医学総合研究所の研究倫理委員会での研究承認を得た上で、情報管理者による匿名化操作を経た後、群馬大学医学部附属病院臨床試験委員会の承認を得たプロトコールにしたがって研究に供した。

また、臨床研究についても群馬大学医学部附属病院臨床試験委員会の承認を得たプロトコールにしたがって研究を進めており、同意の得られた研究協力者についてのみ解析した。

## C. 研究結果

### （1）抗血小板薬による抗うつ薬の抗うつ効果強化療法

シロスタゾールを50追加投与し、5週間後

にはハミルトンうつ病尺度が改善することと、SPECT 測定での平均局所脳血流量が追加後に増加することを明らかにした症例について報告した。他の抗血小板薬である塩酸サルボグレラート（アンブラーグ）についての検討を開始し、一部の症例で有効であることを確認した。なお、シロスタゾールの症例は増えていない。

## (2) 死後脳の解析研究

双極性感情障害では 5 $\mu$ m 以上の比較的大型の GABA 細胞が第二層で正常対照に比して有意に増加、カルビンジン陽性 GABA 細胞は減少傾向を示すが、統合失調症ではいずれも有意に低下していたことを報告した。予備的な検討として、双極性感情障害死後脳では NPY、CCK、ソマトスタチン陽性の GABA 神経の分布には差が認められなかった。

中高年初発うつ病と若年初発の双極性障害死後脳について、抗 IDO 抗体を用いて免疫組織化学的に検索した結果、白質だけでなく、灰白質にも陽性細胞は分布し、しかもミクログリアだけでなく、神経細胞にも陽性細胞が認められた。

## (3) グルココルチコイド反応性の遺伝子の同定

シグナル伝達因子 serum/glucocorticoid regulated kinase (sgk)、転写因子 b-cell leukemia 6 (bcl6)、糖代謝酵素 pyruvate dehydrogenase kinase 4 (pdk4)が検出された。

## D. 考察

若年初発の感情障害における神経発達期の細胞構築学的異常として、BA9 野の皮質第二層の小型神経細胞の構成比異常が見出されているので、この小型神経細胞が GABA 神経かグルタミン酸神経かを同定するため、GABA 神経亜型を詳細に検索し始めた。双極性感情障害では 5 $\mu$ m 以上の比較的大型のカルレチニン陽性 GABA 細胞が正常対照に比

して有意に増加、カルビンジン陽性 GABA 細胞は減少傾向を示すのに、統合失調症ではいずれも有意に低下していることを明らかにした。一方、ペプチド陽性 GABA 神経細胞の分布には双極性感情障害と正常対照で差がなく、したがって、皮質第二層の 5 $\mu$ m 以上の比較的大型のカルレチニン陽性 GABA 神経細胞数の異常が双極性感情障害と統合失調症とを区別する指標になるという興味深い結果を得たことになる。

中高年初発うつ病と若年初発の双極性障害死後脳について、抗 IDO 抗体を用いて免疫組織化学的に検索を開始したが、ミクログリアだけでなく、神経細胞にも陽性細胞があり、他のキヌレニン回路に関わる酵素を用いた、さらに詳細な検討が必要であることが明らかとなった。

うつ病では視床下部-下垂体-副腎皮質系 (HPA 系) に対するフィードバック機能が減弱していることがわかってきており、われわれの検討でも、約 75%の未治療うつ病症例が DEX/CRH 試験で非抑制であった。

この HPA 系の脱抑制に関連する分子機序を明らかにする目的で、視床下部に発現し、グルココルチコイドで発現調節をうける遺伝子の検索を行い、sgk、bcl6、pdk4 に絞込むことができた。感情障害発症関連遺伝子の同定に向けた研究の可能性が出てきたことになる。

## E. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### (1) 論文発表

1. Aihara M, Ida I, Yuuki N, Oshima A, Kumano H, Takahashi K, Fukuda M, Oriuchi N, Endo K, Matsuda H, Mikuni M: HPA axis dysfunction in unmedicated

- major depressive disorder and its normalization by pharmacotherapy correlates alteration of neural activities in prefrontal cortex and limbic/ paralimbic regions. *Psychiatry Research:Neuroimaging*: 155: 245-256, 2007
2. Kumano H, Ida I, Oshima A, Takahashi K, Yuuki N, Amanuma M, Oriuchi N, Endo K, Matsuda H, Mikuni M: Brain metabolic changes associated with predisposition to the onset of major depressive disorder and adjustment disorder in cancer patients. - A preliminary PET study. *J Psychiat Res*, 41: 591-599, 2007
  3. Hanaoka N, Aoyama Y, Kameyama M, Fukuda M, Mikuni M: Deactivation and activation of left frontal lobe during and after low-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation over right prefrontal cortex: A near-infrared spectroscopy study. *Neuroscience Letters* 414: 99-104, 2007
  4. Omori IM, Murata Y, Yamanishi T, Nakaaki S, Akechi T, Mikuni M, Furukawa TA: The differential impact of executive attention dysfunction on episodic memory in obsessive compulsive disorder patients with checking symptoms vs. those with washing symptoms. *J Psychiatric Res*, 41: 776-784, 2007
  5. Takahashi K, Oshima A, Inoue K, Takeyoshi H, Fukuda M, Mikuni M: Novel Augmentation therapy with cilostazol for the geriatric major depressive disorder patient with deep white matter hyperintensities on T2-Weighted brain MRI: A case report. *Pharmacopsychiatry* 41: 37-39, 2008
  6. Sakai T, Oshima A, Nozaki Y, Ida I, Haga C, Akiyama H, nkazato Y, Mikuni M: Changes in density of calcium-binding-protein-immunoreactive GABAergic neurons in prefrontal cortex in schizophrenia and bipolar disorder. *Neuropathology*, in press
- (2)学会発表
1. H Sato, Y Horikawa, K Izuka, N shihara, N sakurai, A Oshima, M Mikuni. Large-scale analysis of glucocorticoid responsive genes in rat hypothalamus. Society for Neuroscience 37<sup>th</sup> annual Meeting, San Diego, CA, Nov. 3-7, 2007
- H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)
1. 特許取得  
出願番号：特願 2003-319502  
生体光計測装置を用いた疾患判定装置
  2. 特許出願中  
提出日：平成 19 年 3 月 30 日  
受付番号：50700650594  
出願番号：特願 2007-93606  
うつ病の予防及び／又は治療剤
  3. 実用新案登録  
なし
  4. その他  
なし

うつ病における認知障害及び認知症への進展に関わる  
神経生物学的基盤解明のための研究

分担研究者 新井 平伊

順天堂大学医学部精神医学講座 教授

**研究要旨：**うつ病における認知機能および認知症への移行に関する生物学的基盤を解明することを目的とし、病相寛解期のうつ病患者に遂行機能および記憶機能検査を施行し、年齢群別に健常対照者との比較、ならびに脳血管性病変との関連を調査した。その結果、寛解期のうつ病患者では一部の遂行機能と記憶機能が障害されており、特に高齢うつ病では語流暢性課題および視覚性再生の成績低下が認められ、語流暢性課題と白質血管病変に関連がみられた。これらの結果から、うつ病では寛解後も一部の認知機能障害は残存し、高齢うつ病では白質病変が遂行機能の低下に関係しており、こうした病変が認知症移行への器質的基盤となっている可能性が示唆された。今後追跡調査をすることによりうつ病から認知症への移行に関する生物学的基盤を解明する一助となるものと考えられる。

**A. 研究目的**

以前より認知症のリスクファクターのひとつに抑うつがあることが知られており、臨床的にもうつ病から認知症へ移行する症例を経験することも多い。近年うつ病をはじめとする感情障害患者の認知機能が注目されており、神経心理学的研究や脳機能画像研究において病相が寛解した後でも一部の前頭葉機能が低下していることが報告されている。一方、老年期うつ病では白質病変が遂行機能と関連していることも報告されており、若年期うつ病と老年期うつ病の病因や経過の違いも指摘されている。前年度、我々はうつ病における認知機能障害および認知症への移行に関する生物学的基盤を解明することを目的とし、寛解に至ったうつ病患者を対象に遂行機能や記憶機能を測定、さらに白質の血管病変との関連性を年齢群別に調査し、遂行機能および記憶機能の一部が寛解した老年期うつ病で低下していること、さらにこの遂行機能の低下に白質の血管病変の有無が関係していることを

報告した。本年度はこの結果を確認すべく、症例数を増やし、より厳密な統計処理を行った。

**B. 研究方法**

対象は抑うつを呈し、順天堂越谷病院に入院した患者のうち、DSM-IVにおいて大うつ病性障害に分類される疾患の診断基準を満たした79例（男性38例、女性41例）で、年齢は25歳から75歳、平均52.4歳であった。頭部CTにおいて白質にみられる低吸収域を白質病変（white-matter lesion; WML）とした（Fazekas criteria）。ただし、明らかな脳梗塞など直接精神症状に影響を与えられ器質的病変を有する症例は除外した。若年うつ病群の7%および高齢うつ病群の54%にWMLを認めた。

これら患者群に対し入院時より経時的にハミルトンのうつ病評価尺度（HAM-D）にて状態評価を行い、HAM-Dが7点以下となった状態で寛解と評価し、以後 Wisconsin Card

Sorting Test (WCST), Stroop Color Word Test (Stroop test), Verbal Fluency Test (VFT) を用いて遂行機能をまた Wechsler Memory Scale Revised (WMS-R)を用いて記憶機能を検査した。

一方、問診および Cornell Medical Index にてスクリーニングされた健常者 85 例 (男性 15 例, 女性 70 例) を健常者群とした。年齢は 18 歳から 75 歳で平均 50.6 歳であった。これらに対し同様の神経心理検査を施行し、患者群, 健常者群をそれぞれ高齢群 (≧60 歳) と若年群 (<60 歳) に分けて, それぞれの神経心理検査の結果を診断 (うつ病群 x 健常対照群) と年齢群 (若年群 x 高齢群) による 2 元配置の分散分析をおこなった。さらに各神経心理検査を従属変数, 年齢, 性別, 教育年数, 白質病変の有無を独立変数とした重回帰分析を行った。

#### (倫理面への配慮)

本研究の実施にあたっては順天堂大学医学部研究等倫理委員会の承認を得た上で, 患者には研究の目的・方法・協力の任意性・個人情報保護などについて十分な説明を行い, 文書にて同意を得た。

#### C. 研究成果

年齢, 教育年数, 推定 IQ に患者群と健常者群で有意な差はなかったが, 健常者群では優位に女性が多かった。

WCST の達成カテゴリー数 ( $F=10.3, p<0.05$ ), ネルソン型保続的エラー ( $F=4.5, p<0.05$ ), Stroop test ( $F=22.5, p<0.001$ ) および LFT ( $F=15.4, p<0.001$ ) において年齢の主効果が認められ, 高齢群で有意に成績が低下していた。Stroop test ( $F=17.2, p<0.001$ ) と LFT ( $F=3.9, p<0.05$ ) のみ診断の主効果が認められ, うつ病群で有意に成績の低下がみられた。LFT では年齢, 診断で交互作用 ( $F=4.3, p<0.05$ ) がみられ, 高齢うつ病群で有意に成績が低下していた。

論理記憶は即時再生, 遅延再生ともに診断による主効果 (即時再生  $F=11.3, p<0.001$ ; 遅延再生  $F=16.7, p<0.001$ ), 年齢による主効果 (即時再生  $F=32.8, p<0.001$ ; 遅延再生  $F=32.3, p<0.001$ ) が有意に認められ, 言語性対連合においても即時再生, 遅延再生がともに診断 (即時再生  $F=20.1, p<0.001$ ; 遅延再生  $F=12.8, p<0.001$ ), 年齢 (即時再生  $F=30.2, p<0.001$ ; 遅延再生  $F=24.3, p<0.001$ ) の有意な主効果が認められた。視覚性再生では即時再生 ( $F=4.0, p<0.05$ ), 遅延再生 ( $F=7.1, p<0.001$ ) とともに診断と年齢の有意な交互作用が認められ, 高齢うつ病群でのみ有意な低下がみられた。

重回帰分析では年齢や性別, 教育年数とは独立に白質病変の有無が LFT の結果に影響を与えていた ( $\beta=-0.26, p<0.05$ )。

#### D. 考察

遂行機能検査においては WCST の結果は高齢群では performance の低下がみられたが, うつ病寛解期と健常者とは過去の報告および前回の我々の結果と同様に違いがなかった。

Stroop test の成績が寛解期のうつ病患者で健常者と比較して若年群, 高齢群ともに有意に低下していたが, この結果も前回と同様であった。うつ病の寛解期における Stroop test の成績低下は過去の報告と一致しており, 過去の報告では Stroop 課題はセット (構え) の転換を評価することから, これは「認知の構え」を転換する柔軟性のなさを示しているとされ, うつ病の素因を反映しているものと考えられている。近年の脳機能画像研究ではうつ病が寛解した後でも前頭前野や帯状回の機能異常が残存することが示されており, 最近 Stroop 課題を用いた fMRI 検査において, うつ病患者の前部帯状回や背外側前頭前野の機能異常が報告された。こうした報告より, 今回みられた寛解期のうつ病患者の Stroop test の成績低下は, うつ病における前頭前野や帯状回の機能異常を反映しているのかもしれない。

VFT の成績も前回の結果と同様に, 高齢群

と若年群で異なったパターンを示し、寛解期の高齢うつ病患者でのみ低下しており、さらにこの成績に白質の血管病変の有無が影響を与えることが示された。老年期うつ病患者では若年者のうつ病や健常高齢者に比べて白質の血管性病変が多く、これに関連する遂行機能が障害されていることが知られている。近年の脳機能画像研究でVFTの成績と前頭前野が関係していることが示された。これらより、寛解期の高齢うつ病患者におけるVFTの成績低下は白質の血管性病変により前頭葉への投射経路が障害されることによって言語に関連する前頭葉機能障害が引き起こされたものかもしれない。

記憶機能に関して、今回の結果ではうつ病群では健常対照群と比較して、寛解期においても記憶機能が全般的に低下しているが、視覚性再生は高齢うつ病でのみ低下しており、遂行機能と同様に記憶機能も若年うつ病と高齢うつ病で障害のパターンが一部で異なることが示された。うつ病における記憶機能に関しては、病相期には低下するが、治療によりうつが軽快すると記憶機能も改善するという報告がある。今回の我々の結果と併せて考えるとうつ病は寛解しても記憶機能は完全には改善しないか、または、発病以前より記憶機能の低下があった可能性が示唆された。

うつ病では海馬体積の低下や海馬の神経新生の障害が知られているが、今回の記憶障害もこうした海馬の機能障害を反映している可能性も示唆される。

#### E. 結論

今回の結果から、うつ病患者では症状が寛解した後でも前頭葉を中心とした認知機能障害、記憶機能障害が存在していることが確認された。特に高齢うつ病患者ではこうした認知機能の障害が若年うつ病と異なり、白質血管病変が一部の認知機能に影響を与えている可能性が示唆された。これらの結果は老年期のうつ病では認知症移行の器質的基盤がすで

に存在している可能性を示唆しており、今後追跡調査をすることによりうつ病から認知症への移行に関する生物学的基盤を解明する一助となるものと考えられる。

#### 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

1. 中野祥行, 馬場元, 前嶋仁, 北島明佳, 酒井佳永, 鈴木利人, 新井平伊. 年齢群別にみたうつ病寛解期における遂行機能. 日本うつ病学会総会 (2007) 札幌
  2. 前嶋仁, 馬場元, 中野祥行, 北島明佳, 鈴木利人, 新井平伊. うつ病患者の寛解期における記憶機能に関する研究. 日本うつ病学会総会 (2007) 札幌
  3. Maeshima H, Baba H, Nakano Y, Kitajima A, Sakai Y, Suzuki T, Arai H. Memory impairments during remitted state in patients with depression. ICGP (2007) San Diego
  4. Nakano Y, Baba H, Maeshima H, Kitajima A, Sakai Y, Baba K, Suzuki T, Arai H. Differences of executive dysfunction in remitted state of young and elderly major depressive disorders. ICGP (2007) San Diego
- #### 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

うつ病死後脳解析からみた若年発症と  
高齢初発うつ病の発症脆弱性の神経病理学的研究

分担研究者 池田 研二  
慈圭病院・慈圭精神医学研究所 医師

**研究要旨：**退行期から老年期に初発する高齢者のうつ状態は若年者のうつ病と異なり，器質要因の関与が示唆されている．これまでの本研究において高齢者のうつ病患者脳を病理組織学的に検討した結果，正常対照群に比して前頭葉白質の炎症性反応の亢進が示唆される症例が認められた．本年度は，前年度に引き続き，従来からのホルマリン固定パラフィン病理標本セット，および海外脳バンクから提供を受けたパラフォルムアルデヒド固定凍結浮遊病理標本セットを用いて，脳血管内皮の炎症性活性化，血管内～周囲の白血球接着～浸潤，さらにミクログリア総数などについて，組織定量的に検討した．

**A. 研究目的**

高齢者のうつ病は若年者のうつ病と異なり，脳の器質的病変な背景があることが多い．これまでの研究で，虚血や様々な器質的病変に伴う炎症反応の関与を示唆する所見が得られたが十分なエビデンスとは言えないため，現在利用可能なふたつの標本セットを用いて，より多くの分子の発現，炎症・虚血関連の細胞変化を検討する．

**B. 研究方法**

標本セット1は東京都精神医学総合研究所に保存されている剖検脳から，退行期～老年期発症のうつ病のうち脳血管障害病変を伴わない群6例，伴う群5例さらに正常対照群5例のホルマリン固定パラフィン標本の前頭前野である．標本セット2は米国 Sun Health Research Institute (AZ)の脳bankに病歴の検索を依頼し，アルツハイマー病をはじめとする各種神経変性疾患の診断基準を満たさず，死亡直前まで「うつ」の治療を受けていた高齢者5例，および年齢・MMSEスコア・アルツ

ハイマー病 Braak NFT stage を一致させた対照高齢者5例を選んで，前頭葉上～中前頭回の4%パラフォルムアルデヒド短時間固定，凍結浮遊切片の提供を受けたものである．両セットは一長一短があり，標本セット1は標本作成条件が原因で，免疫組織化学的検索が可能な分子が非常に限られている．標本セット2は多数の分子について免疫組織化学が可能であるが，診断基準を満たしてはいないものの，アルツハイマー病様老人性変化を伴う症例が多く含まれている上，海外の脳bankに依存しているために1例あたり使用可能な標本の枚数が少ない．

そこで両者を組み合わせて，免疫組織化学により，慢性虚血を主たる要因とする低レベルの慢性炎症反応の検出を試みた．染色結果は，各症例・染色とも多数視野を用いて，陽性構造を目視により半定量的に計数するか，あるいは高解像度デジタルカメラで撮影して NIH image による免疫陽性構造の定量的解析を行った．

### (倫理面への配慮)

標本セット1はすべて平成13年以前の古い解剖例であるため、匿名化により個人情報保護を図った。標本セット2の症例はいずれも米国 Sun Health Research Institute (AZ)への brain donation に対する生前合意を得ており、標本の提供は同 Institute の倫理委員会の承認を得ている。また本研究全体として、上記のような条件のもとに、東京都精神医学総合研究所の倫理委員会の承認を得ている。

### C. 研究成果

標本セット1において、Leukocyte common antigen (LCA: CD45)陽性白血球を血管内あるいは血管壁・血管周囲に伴う前頭葉白質血管数を定性的に評価し、標本間の順位で表して比較した。脳血管病変を伴う「うつ」群では伴わない「うつ」群よりややLCA陽性細胞を伴う白質血管の出現頻度が高い傾向は見られたが、統計学的に有意ではなかった。次に標本セット2のやはり前頭葉において、上前頭回・中前頭回境界部位の皮質直下白質より深い部位の白質で、CD11a陽性白血球を組織定量して「うつ」と対照とを比較したが、やはり明らかな差は得られなかった。近接標本の同じ部位における血管内皮 ICAM-1 発現を同じく組織定量したところ、僅かに「うつ」群で発現亢進の傾向は見られたが、やはり有意ではなかった。また同一部位において活性化ミクログリアにのみ発現する 25F9 分子の組織定量を試みたが、両群間に差を見出すことはできなかった。次に、オリゴデンドログリアの細胞マーカーである Olig2 発現を組織定量することにより、虚血や炎症の結果として生じる可能性が高いオリゴデンドログリアの減少を評価したが、これは標本セット2においても症例間での染色性のバラつきがあり、「うつ」5例中2例は検討不可能であった。残り症例に関しては、「うつ」例で対照よりオリゴデンドログリアが少ない傾向が見られたが、限られた例数であるため統計学的に有意

な結果にはならなかった。

次いで標本セット2において、シクロオキシゲナーゼ(COX)-1の発現を調べた。COX-1は基本的には恒常的に発現される分子で、活性化等による発現亢進は生じないと考えられ、脳では主としてミクログリアに局在する。そこでCOX-1の組織定量によってミクログリアの細胞数の概略を「うつ」、対照で比較したが、皮質・白質とも両群間に差は認められなかった。なお、今のところ意味づけは不明であるが、「うつ」群の中に1例、前頭葉皮質の錐体細胞において高頻度にCOX-1発現が認められる症例があった。対照群および、本研究者が他の研究において過去に検索した10例ほどにおいて、このような所見は得られていない。

### D. 考察

剖検脳の炎症性変化の評価、虚血性変化の評価、それらの病変の相互関係などは、死戦期の問題：全身炎症、虚血、低酸素症などの修飾を受けて検出が難しくなる。また高齢者では様々な程度の老人性変化（アルツハイマー病変など）が、同様の細胞性反応を引き起こす。多数例の使用が可能な場合は、それによるノイズのキャンセルが可能であるが、本研究の現状ではそれは望むことができない。

ただ、標本セット2において対照のうち1例はおそらく Binswanger 型白質病変を有しており、除外することができる。また組織定量の部位、使用するマーカー分子の選定など、今後さらに工夫を加えて、「うつ」の有無との関連が明確な所見を抽出する努力を進めることがひとつの方法と考えられる。

また標本セット1において、今後も順次異なる抗体のテストを進めて、ホルマリン固定パラフィン標本においても使用可能な抗体を見出す試みを続けることも重要である。

前頭葉大脳皮質の錐体細胞にCOX-1発現が高頻度で認められたうつ症例に関しては、本研究以外の標本において多数例で検討してこのような所見の頻度を明らかにし、それと並