

200833009A

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)

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 三國 雅彦  
(群馬大学大学院医学系研究科神経精神医学分野)

平成21年(2009)年3月

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

(課題番号 H18 - こころ - 一般 - 010)  
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

平成20年度 総括・分担研究報告書

平成21年 (2009) 年 3 月

研究代表者 三 國 雅 彦

(群馬大学大学院医学系研究科神経精神医学分野)

# 目 次

I. 総括研究報告書	研究代表者 三國雅彦 …… 1
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	三國雅彦 …… 7
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	新井平伊 …… 12
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	池田研二 …… 15
気分障害患者における遺伝子発現調節異常と薬物治療反応性に関する研究	渡辺義文 …… 18
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関する脳科学研究	白尾智明 …… 21
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神経生理学的研究	川口泰雄 …… 24
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	加藤忠史 …… 27
III. 研究成果の刊行一覧表	…… 29
IV. 研究成果の別刷	…… 33

# 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)

研究代表者 三國 雅彦

群馬大学大学院医学系研究科神経精神医学分野 教授

研究要旨：

本研究は神経の発生・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に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それぞれの分担研究者がさらに研究を推進し、以下のような成果を得た。

- (1) 平均 35 歳のうつ病患者と健常者を対象に、右手首内側の右正中神経への電気刺激による体性感覚誘発磁場について Neuromag 社製 306 チャンネル全頭型脳磁図計を用いて解析し、各被験者データで Root mean squares (RMS) 加算平均波形を得、刺激後 20ms 付近のピーク (N20m) と 60ms 付近のピーク (P60m) の潜時、RMS 値について検討した。その結果、うつ病患者では P60m の潜時が有意に延長したが、RMS 値については健常者とうつ病者で有意差がないこと、第一次体性感覚野 (S1) への視床皮質投射を反映すると考えられる N20m の潜時・RMS 値はうつ病と健常者で全く差がないことを明らかにした。P60m は S1 での GABA 作動性介在神経の活動に関連すると報告されているので、うつ病では GABA 作動性介在神経の活動が変化している可能性を示唆している。
- (2) 90% の皮質 GABA 細胞がニューロペプチド・アクチン結合蛋白質・カルシウム結合蛋白質などの 6 つの分子マーカーのどれか一つを発現することを明らかにした。
- (3) 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を明らかにしたが、その後の二年間の追跡研究で、若年群が有意な成績の改善を示したのに対して、高齢群では有意差が認められなかった。記憶機能課題においても、論理記憶、即時再生、遅延再生ともに若年群では成績の改善がみられたが、高齢群ではいずれも有意差がなかった。
- (4) 古いホルマリン固定パラフィン標本を対象として、再度組織病理学的に検索し、高齢

初発うつ病で虚血や様々な器質的病変に伴う慢性炎症反応の関与を示唆するマイクログリア活性化所見を確認した。しかし、これらの標本では解析できる分子がきわめて限られることから、米国 brain bank から得たパラホルムアルデヒド固定凍結浮遊切片を用いて、高齢者うつ群と高齢対照者群との間で、種々の炎症関連分子の発現を比較したが、両群間で有意差は認められなかった。

- (5) 双極性、単極性の感情障害リンパ球における、細胞接着因子と栄養因子の遺伝子発現を検索し、双極性のうつ状態では NCAM mRNA の発現低下、L1 mRNA の発現増加が認められ、うつ状態依存的な変化であった。一方、大うつ病性障害のうつ病相において GDNF などの mRNA の発現低下が認められ、うつ状態依存的な変化であったが、双極性では変化がないことを明らかにした。また、L1 mRNA 発現量は薬物治療反応群に比べて治療抵抗性群で有意に低下していることを明らかにした。
- (6) 気分障害をしばしば伴うウォルフラム病の原因遺伝子である Wfs1 のノックアウトマウスの躁うつ病モデルマウスとしての妥当性を検証し、情動に基づく運動(受動回避学習、積極回避学習、モリス水迷路)で、動作が遅いという特徴を明らかにした。
- (7) 種々のアクチン結合蛋白の成長円錐内での局在を免疫組織化学的に解析し、ゲルソリン、ニューラビン I I、ドレブリン E は成長円錐のアクチン弓に濃縮していることを発見した。また、微小管はドレブリン結合型のアクチン繊維と結合できることを明らかにするとともに、ドレブリンのノックダウンや過剰発現の実験から成長円錐の伸展のためにドレブリンが必要な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神経精神医学分野教授)  
新井 平伊 (順天堂大学医学部精神医学講座教授)  
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 (山口大学大学院医学系研究科高次脳機能病態学分野教授)  
白尾 智明 (群馬大学大学院医学系研究科神経薬理学分野教授)  
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

本研究は神経の発生・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索し、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。

うつ病の初発年齢は20歳代と50歳代にビ

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。特に、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を明らか



にし、GABA 神経亜型についての詳細な検討を行ってきた。

また、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。

そこで、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きた。

一方、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に絡み合った病態が出現すること、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説明も併せて検討してきた。

本年度はこれまでの結果を一層確固たるものとし、今後の研究を展開のための予備的検討にも着手し、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生省指針の 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。米国 Sun Health Research Institute の症例はすべて brain

donation に対する生前合意を得ており、標本の外部施設への提供は、同 Institute の倫理委員会の承認を得ている。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が推進された。

## 若年発症の感情障害の皮質における GABA 神経亜型の分布異常に関連する基礎的並びに臨床的研究

三國らは躁うつ病などの感情障害の死後脳解析を行った結果、若年発症群では前頭前野の GABA 神経亜型の分布異常を明らかにしたことから、皮質層構造の異常に結びつき、GABA 神経と関連する情報処理機能の異常の有無を明らかにする新たな臨床研究に取り組んだ。平均 35 歳のうつ病患者と性・年齢をマッチさせた健常者を対象に、右手首内側の右正中神経を電気刺激 (強度は感覚閾値の 1.5 倍、0.1s) した際の体性感覚誘発磁場 (Somatosensory evoked field; SEF) について、Neuromag 社製 306 チャンネル全頭型脳磁図計を用いて解析し、各被験者データで Root mean squares (RMS) 加算平均波形を得、刺激後 20ms 付近のピーク (N20m) と 60ms 付近のピーク (P60m) の潜時、RMS 値について検討した。その結果、うつ病患者では P60m の潜時が有意に延長していたが、RMS 値については健常者とうつ病患者で有意差がないことが明らかになった。P60m は第一次体性感覚野 (S1) への GABA 作動性介在神経の活動に関連すると報告されているので、うつ病では GABA 作動性介在神経の活動開始の遅れとそれを補う活動性の保持が認められたことになる。一方、S1 への視床皮質投射を反映すると考えられる、N20m の潜時・RMS 値はうつ病と健常者で全く差がないことも明らかにできた。したがって、視床から皮質への情報の受容には差がなく、その後の錐体細胞からの情報の放出までの間での機能異常が見

出されたことになり、この間の調節系として GABA 神経の関与が知られ、ベンゾジアゼピン系の抗不安薬がこの 100ms レベルの情報処理に影響すると報告されている。若年発症の感情障害の情報処理の機能異常を見出した可能性があり、診断的なツールとなる可能性が示唆される。

川口らは電気・形態・分子的性質や軸索投射パターンを組み合わせることにより、前頭皮質の機能的ニューロンタイプを明らかにできる可能性に着目し、前頭皮質局所回路を大脳システムの中での機能的モジュールとして捉え、うつ病などを引き起こす皮質局所回路をニューロンタイプのレベルから解明することを目指している。そこで、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研究に従事してきた。すなわち、GABA 細胞蛍光標識の利点を生かして、パルプアルブミン、ソマトスタチン、VIP、コレシストキニン、カルレチニン、アルファ-アクトニン-2 という、GABA 細胞の細胞体に発現する 6 種類のペプチド・蛋白質の発現様式を定量的に調べた結果、GABA 細胞の中で各物質の発現割合をみると、1 層、2/3 層、5 層では 9 割以上、6 層では 9 割近くの GABA 細胞が 6 つのマーカーの内、少なくとも一つを持っていることを明らかにした。したがって、殆どの皮質 GABA 細胞がニューロペプチド・アクトニン結合蛋白質・カルシウム結合蛋白質などの 6 つの分子マーカーのどれか一つを発現していることを明らかにしたことは、多様であると考えられている GABA 細胞の同定に今後有用であるといえることができる。

とくに注目すべき所見として、これまでの死後脳研究で双極性障害と統合失調症とを、カルシウム結合タンパク質であるカルレチニン陽性 GABA 神経の出現量で区別できることを三國らは報告してきたが、そのカルレチニン陽性 GABA 神経の樹状突起は興奮性

のシナプス入力が多く、他の GABA 神経亜型とは明らかに異なることを明らかにした点である。

また、大脳新皮質ニューロンは睡眠中に脱分極の Up 状態では、視床由来の 7~14 ヘルツのスピンデル波と、皮質自身で作る 30~80 ヘルツのガンマ波がのっていることが知られているが、パルプアルブミン陽性の fast spiking interneuron (FS) がガンマ波とよく同期し、発火位相で分化していることを明らかにし、FS 細胞が認知記憶で重要な役割をしている可能性を示唆している。

#### 中高年初発群での前頭前野の微細な脳血管障害と、神経心理学的評価に関連する研究

池田らは中高年初発群では前頭前野の微細な脳血管障害としてのミクログリアの出現や細動脈硬化所見を見出し、その上、三國らと新井らは抗うつ薬治療抵抗性の MRI T2 高信号所見を有する患者への抗血小板薬シロスタゾール療法の有効性を明らかにした。そこで、三國らはシロスタゾールの血管内皮への作用機序を明らかにする課題に着手した。

血管内皮の損傷修復や糖尿病治療に応用されている薬剤の作用部位であり、血管内皮細胞の転写因子である peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) に対する抗血小板薬の作用の有無を、ヒトの脳血管内皮細胞の HBMEC を用い、ピオグリタゾン刺激での FAT/CD 36 の転写の亢進の有無を RT-PCR で半定量する測定系で解析した。その結果、抗血小板薬シロスタゾールの PPAR $\gamma$  に対するアゴニスト作用は見いだされなかった。

池田らは以前行った古いホルマリン固定パラフィン標本を対象として、再度組織病理学的に検索し、高齢初発うつ病で虚血や様々な器質的病変に伴う慢性炎症反応の関与を示唆するミクログリア活性化所見を確認し



た。しかし、これらの標本では解析できる分子がきわめて限られることから、主として米国 brain bank から得たパラフォルムアルデヒド固定凍結浮遊切片を用いて、高齢者うつ病と高齢対照者群との間での、種々の炎症関連分子の発現を比較した。安定して染色できる CD68、および近年、家族性前頭側頭葉変性症の原因遺伝子の一つとして同定され、中枢神経系では主として活性化ミクログリアの一部に認められる progranulin の発現を Sun Health 標本セット（前頭葉の皮質、および白質）において組織定量し、うつ病と対照高齢者の間で比較したが、両群間で有意差は認められなかった。

最近の剖検率の低下により本研究を開始して以降の3年間における高齢者うつ病症例の剖検は1例のみであり、一定数の症例を検討するために海外 brain bank からの標本提供を受けたが、高齢者うつ病とされていた中には、双極性障害や若年発症の高齢うつ病例が含まれてしまった可能性は否定できない。

一方、感情障害には微細な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点以下となつてほぼ寛解状態となつ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 の成績が寛解期となつたうつ病患者では若年群、高齢群ともに健常者に比して有意に低下していることを明らかにしてきた。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を明らかにしてきた。今年度は若年群約 30 症例、高齢群約 15 症例を追跡調査し、寛解直後と寛解2年後の認知機能を比較検討した。その結果、Stroop test では寛解2年後の若年群が有意

な成績の改善を示したのに対して、高齢群では有意差が認められなかった。記憶機能課題においても、論理記憶、即時再生、遅延再生ともに若年群では成績の改善がみられたが、高齢群ではいずれも有意差がなかった。したがって、若年群では遂行機能や記憶機能の改善がみられたが、高齢うつ病ではその改善がみられず、高齢うつ病における認知機能障害にはより器質的要因が関係している可能性が改めて示唆された。

#### 双極性障害のうつ状態と大うつ病性障害とに関連する末梢指標ならびに治療反応性

渡辺はこれまで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関連せず、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て報告した。次に、GRにより発現制御を受け、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 発現量を解析してきた。今年度は栄養因子、細胞接着因子に注目して、検討を進めた結果、双極性障害患者群うつ病相における NCAM mRNA 発現量は健常群に比べ有意に低下、L1 mRNA 発現量は健常群に比べ有意に増加していた。これらの変化は、寛解期では有意差が認められず、うつ状態に依存的な変化であった。integrin、cadherin、ICAM mRNA 発現量においては、気分障害患者群と健常群に有意差は認められなかった。

一方、気分障害患者末梢血白血球における神経栄養因子群 mRNA 発現量を検討した結果では、大うつ病性障害患者群うつ病相における NT-3、GDNF、ARTN、NRTN mRNA 発現量は健常者に比べ有意に減少していたが、寛解期では有意な差は認められなかった。

しかし、双極性障害患者群では栄養因子群の発現量に何ら差を認めなかった。したがって、双極性障害のうつ状態と大うつ病性障害とは末梢指標に差が認められた。

また、薬物治療抵抗群と薬物治療反応群における細胞接着因子や栄養因子の発現量を検討した結果、L1 mRNA 発現量は薬物治療反応群に比べて治療抵抗性群で有意に低下していることを明らかにした。したがって、難治例におけるバイオロジカルマーカーとなる可能性が示唆された。

### 器質の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。発生過程における神経細胞は側脳室下帯で分裂・増殖し、その後その細胞本来場所へ移動する。そして樹状突起を成長させるとともに、神経軸索を伸ばし、遠く離れた目的神経細胞に投射し、機能的神経回路網を形成する。この神経軸索の成長速度やその方向性を決めるのに重要な役割を果たす構造は神経軸索の末端に形成される成長円錐である。今年度は軸索の成長メカニズムを解明するために、成長円錐内でのアクチン関連タンパクの分布を解析し、その中でアクチン弓にのみ特徴的に存在している蛋白を同定し、次にその蛋白の発現量変化が軸索成長に及ぼす影響を解析した。その結果、種々のアクチン結合蛋白の成長円錐内での局在を免疫組織化学的に解析し、ゲルズリン、ニューラビン I I、ドレブリン E は成長円錐のアクチン弓に濃縮していることを発見した。また、微小管はドレブリン結合型のアクチン繊維

と結合できることを明らかにするとともに、ドレブリンのノックダウンや過剰発現の実験から成長円錐の伸展のためにドレブリンが必要なことを明らかにした。アクチンと微小管がドレブリンを介して結合することにより制御されている新たな可能性が示唆されたことになる。

加藤は躁うつ病の動物モデルを作成すると共に、その病態を解析し、新規気分安定薬のスクリーニング法を確立する研究に従事してきた。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、行動学的分析所見や 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示唆されることを明らかにした。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おり、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、実際、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。

今年度は、気分障害をしばしば伴うウォルフラム病の原因遺伝子である Wfs1 のノックアウトマウスの躁うつ病モデルマウスとしての妥当性を検証した。その結果、情動に基づく運動（受動回避学習、積極回避学習、モリス水迷路）で、動作が遅いという特徴が見られた。その他の試験では運動面に異常が見られず、これらの情動に基づく運動のみが遅いことから、これらの所見はうつ病患者に見られる「制止」に類似しているという興味深い知見を得た。このマウスが気分安定薬の評価に利用可能である可能性が示唆された。

## 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神経精神医学分野 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、死後脳解析を行った結果、若年発症群では前頭前野の神経発達期の細胞構築異常としての GABA 神経亜型の分布異常、中高年初発群では前頭前野の微細な脳血管障害としてのミクログリアの出現や細動脈硬化所見を見出し、抗うつ薬治療抵抗性の MRI T2 高信号所見を有する患者への抗血小板薬シロスタゾール療法の有効性も明らかにした。したがって、皮質層構造の異常に結びつき、GABA 神経と関連するような情報処理機能の異常の有無を神経生理学的に明らかにすること、シロスタゾールの血管内皮への作用機序を明らかにすることが新たな課題となり、以下のように研究を推進し、成果を得た。

- (1) 平均 35 歳のうつ病患者と性・年齢をマッチさせた健常者各 10 名を対象に、右手首内側の右正中神経を電気刺激し、体性感覚誘発磁場について Neuromag 社製 306 チャンネル全頭型脳磁図計を用いて解析し、各被験者データで Root mean squares (RMS) 加算平均波形を得、刺激後 20ms 付近のピーク (N20m) と 60ms 付近のピーク (P60m) の潜時、RMS 値について検討した。その結果、うつ病患者では P60m の潜時が有意に延長していたが、RMS 値については健常者とうつ病患者で有意差がないことを明らかにした。P60m は第一次体性感覚野 (S1) への GABA 作動性介在神経の活動に関連すると報告されているので、うつ病では GABA 作動性介在神経の活動開始の遅れとそれを補う活動性の保持が認められたことになる。一方、S1 への視床皮質投射を反映すると考えられる、N20m の潜時・RMS 値はうつ病と健常者で全く差がないことも明らかにできた。
- (2) 血管内皮の損傷修復や糖尿病治療に応用されている薬剤の作用部位であり、血管内皮細胞の転写因子である peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) に対する抗血小板薬の作用の有無を、ヒトの脳血管内皮細胞培養系の HBMEC を用い、ピオグリタゾン刺激での FAT/CD 36 の転写の亢進有無を RT-PCR で半定量する測定系で解析した。その結果、抗血小板薬シロスタゾールの PPAR $\gamma$  に対するアゴニスト作用は見いだされなかった。

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は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器質的脆弱性が存在することを明らかにしてきた。略述すると、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たところ、ペプチド陽性 GABA 神経の細胞構築には異常はなかったが、カルシウム結合タンパク質陽性 GABA 神経の皮質第二層での発現には統合失調症と

も異なる異常が見出された (Sakai et al, 2008)。また、退行期の微細な脳血管障害については細動脈硬化のある症例ばかりでなく、無い症例でもミクログリアの活性化が認められている。中高年初発のうつ病ではMRI T2強調画像での前頭葉白質における高信号が高頻度に認められ (Takahashi et al, 2008a)、そのような症例で抗うつ薬療法抵抗性の症例に抗血小板薬を併用するとうつ症状が改善するとともに、SPECTでの局所脳血流低下も改善することを明らかにした (Takahashi et al, 2008b)。

本年度は、GABA神経の垂型の細胞構築の異常と関連するような神経生理学的機能異常がうつ病に存在するか、また、抗血小板薬の血管内皮細胞への効果がどのように神経細胞の機能の修復に関与するかを明らかにする研究に着手した。以下に本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とその作用機序に関する研究

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とともに、追跡調査をすることとした。

次に、血管内皮の損傷修復や糖尿病治療に応用されている薬剤の作用部位であり、血管内皮細胞の転写因子であるperoxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  (PPAR $\gamma$ )を取り上げて、抗血小板薬の作用との関連の有無を検討した。群馬

大学循環器内科では、心血管内皮細胞において、PPAR $\gamma$ のアゴニストであるピオグリタゾン刺激で、PPAR $\gamma$ の標的遺伝子であるfatty acid translocase (FAT/CD 36)の転写が亢進することを見出していたので、循環器内科と共同で、ヒトの脳血管内皮細胞のHBMEC並びにラットの脳血管内皮細胞のRBMECを用いて、ピオグリタゾン刺激でのFAT/CD 36の転写亢進の有無をRT-PCRで半定量する測定系を確立して検討し、血小板に特異的なフォスフォジエステラーゼ3の阻害作用を有する抗血小板薬シロスタゾールがPPAR $\gamma$ に対するアゴニスト作用を有するか、否かを検討した。

### (2) 細胞構築の差異を神経生理学的機能検査で解析する方法の開発

対象は平均35歳のうつ病患者と性・年齢をマッチさせた健常者各10名であり、右手首内側の右正中神経を電気刺激(強度は感覚閾値の1.5倍、0.1s)した。その際、視覚に注意を向けさせる条件、体性感覚に注意を向けさせる条件、それらをしてしない自然体の条件について体性感覚誘発磁場(Somatosensory evoked field; SEF)を測定した。MEG測定は当教室所属のNeuromag社製306チャンネル全頭型脳磁図計を用い、サンプリング周波数は600Hzで、加算回数は100回以上とした。得られた脳磁場波形を処理して、各被験者データでRoot mean squares (RMS)加算平均波形を得、刺激後20ms付近のピーク(N20m)と60ms付近のピーク(P60m)の潜時、RMS値について検討した。

### (倫理面への配慮)

この臨床研究については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とその作用機序に関する研究

シロスタゾールで臨床症状が改善しても SPECT での血流低下症例につき一年間の追跡調査で SPECT 検査を実施し、血流増加を確認できた。

PPAR $\gamma$ のアゴニストであるトリグリタゾンやピオグリタゾン刺激で、PPAR $\gamma$ の標的遺伝子である FAT/CD 36 の転写が亢進することを見出していた循環器内科と共同で、ヒトとラットの脳血管内皮細胞のセルラインを用い、ピオグリタゾン刺激での FAT/CD 36 の転写亢進の有無を RT-PCR で半定量したところ、心血管系と同様に脳血管系由来内皮細胞でも転写が亢進した。しかし、抗血小板薬シロスタゾールの PPAR $\gamma$ に対するアゴニスト作用は見いだされなかった。

### (2) 細胞構築の差異を神経生理学的機能検査で解析する方法の開発

視覚に注意を向けさせる条件、体性感覚に注意を向けさせる条件、それらをしない自然体の条件の三条件に関わらず、うつ病患者では P60m の潜時が有意に延長していたが、RMS 値については健常者とうつ病患者で有意差がなかった。一方、N20m の潜時・RMS 値はうつ病と健常者とで全く差がなかった。

## D. 考察

PPAR $\gamma$ 刺激に対する FAT/CD 36 の転写亢進の系を指標にすると、抗血小板薬シロスタゾールは脳血管由来内皮細胞培養系における PPAR $\gamma$ 系にアゴニストとして

は作用していないことが明らかになったが、他の PPAR $\gamma$ 系の下流の指標も検索していないので、シロスタゾールが PPAR $\gamma$ 系に対するアゴニスト作用を欠くと結論付けることはまだできない。しかし、ヒトの脳血管由来の内皮細胞培養系でも PPAR $\gamma$ 刺激に対する FAT/CD 36 の転写亢進の系を明らかにすることができたことは、脂肪酸の代謝系が脳血管内皮細胞において有効に機能していることを示唆する新知見であるといえる。

若年発症の双極性障害の死後脳において GABA 神経の亜型の細胞構築の異常を見出したが、この GABA 神経の亜型の細胞構築の異常と関連するような神経生理学的機能の異常を見出す検査法が確立できるかが大きな課題であった。従来から脳波検査による事象関連電位からみた各種精神疾患の情報処理機能の病態研究が進められているが、いずれも P300 などの遅い成分と精神疾患との関連の解析が主体であり、MEG が導入されてようやく、前注意の情報処理のような 150ms～200ms の解析が可能となり、われわれは感情障害での機能低下を報告した (Takei et al, 2009)。しかし、視床からの情報の一次知覚野での受容から錐体神経細胞を介する情報の放出までの間の 100ms のレベル以下での機能解析はうつ病では成功していなかった。

本年度の研究で、視覚に注意を向けさせる条件、体性感覚に注意を向けさせる条件、それらをしない自然体の条件の三条件に関わらず、うつ病患者では P60m の潜時が有意に延長したが、RMS 値については健常者とうつ病患者で有意差がなかった。P60m は第一次体性感覚野 (S1) への GABA 作動性介在神経の活動に関連すると考えられているので、うつ病では GABA 作動性介在神経の活動開始の遅れとそれを補う活動性の保持が認められた



ことになる。

一方、当然のことながら、S1への視床皮質投射を反映すると考えられる、N20mの潜時・RMS値はうつ病と健常者で全く差がなかった。したがって、視床から皮質への情報の受容には差がなく、その後の錐体細胞からの情報の放出までの間での機能異常が見出されとということができ、この間の調節系としてGABA神経の関与が知られており、ベンゾジアゼピン系の抗不安薬がこの100msレベルの情報処理に影響すると報告されている。われわれがこれまで明らかにしてきたGABA神経亜型の細胞構築の異常は前頭前野BA9であり、この知覚野の皮質の細胞構築においてGABA亜型に異常があるかは全く検索されてはいない。しかし、若年発症の感情障害の情報処理の機能異常を見出したということができ、診断的なツールとなる可能性が示唆されている。

#### E. 健康危険情報

なし

#### F. 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.

6. Sakai T, Oshima A, Nozaki Y, Ida I, Haga C, Akiyama H, Nakazato 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

G. 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. 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、我々は昨年度までに病相寛解期のうつ病患者に神経心理学的検査を施行、脳血管性病変との関連を調査した。その結果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。今回はこれらの患者を追跡調査し、寛解直後と寛解2年後の認知機能を比較検討した。その結果若年うつ病では遂行機能や記憶機能の改善がみられたが、高齢うつ病ではその改善がみられず、高齢うつ病における認知機能障害にはより器質的要因が関係している可能性があらためて示唆された。

#### 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。前年度までに、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。本年度は前回調査後約2年の長期寛解にある患者に同様の神経心理検査を施行し、寛解直後の結果との比較を行った。

#### B. 研究方法

対象は 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、前年度までに本研究のための神経心理検査を受けた患者のうち、臨床的に寛解が維持され、追跡

調査を実施した47例（男性21例、女性26例）で、再検査までの日数は  $732.4 \pm 300.0$  (mean  $\pm$  S.D.) 日であった。これら患者に対し前回同様 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。

寛解直後を T0、今回を T1 とし、神経心理検査の結果が T0 と T1 で有意な違いがあるかを高齢群 ( $\geq 60$  歳) と若年群 ( $< 60$  歳) に分けて分析した (T 検定)。

#### (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. 研究結果

若年群31例の年齢は  $45.3 \pm 8.7$  歳で、高齢群16例は  $70.4 \pm 4.2$  歳であった (mean  $\pm$  S.D.)。教育年数は若年群が  $13.1 \pm 1.8$  年、高齢群が  $10.8 \pm 2.8$  年で (mean  $\pm$  S.D.)、若年群が有意に長かった。推定 IQ および再検査までの日数に両群で有意な差はなかったが、高齢群では有意に女性が多かった。

遂行機能検査において、WCST の保続的エラーは若年群、高齢群ともに T0 と T1 で



有意な差はなかった。Stroop test では若年群が T0 と比較して T1 で有意な成績の改善 ( $p < 0.05$ ) がみられたのに対して、高齢群では有意差はなかった。VFT では若年群において、有意ではないものの、T1 で T0 と比較して成績改善の傾向 ( $p = 0.09$ ) がみられたが、高齢群では差がなかった。

記憶機能検査において、論理記憶は若年群で即時再生 ( $p < 0.001$ )、遅延再生 ( $p < 0.001$ ) とともに T1 での成績改善がみられたが、高齢群ではいずれも T0 と T1 で有意な差はなかった。言語性対連合では若年群で、即時再生の有意な改善 ( $p < 0.01$ ) がみられ、遅延再生が統計的に有意ではないが、改善の傾向 ( $p = 0.07$ ) がみられた。高齢群ではいずれも有意な改善はみられなかった。視覚性再生では若年群、高齢群ともに即時再生、遅延再生のいずれも有意な改善はみられなかった。

#### D. 考察

遂行機能検査においては WCST の結果は若年群、高齢群ともに平均 2 年後の再検査で performance の改善はみられなかった。WCST は過去の報告と同様寛解直後において両年齢群とも健常者との差がなかったため、寛解直後より改善していたものと考えられる。

Stroop test および語の流暢性に関して、Biringer らは 20 歳～50 歳のうつ病患者 30 例を約 2 年間追跡調査し、完全寛解したうつ病でも Stroop test と、VFT と同じ語流暢性検査のひとつである Controlled Oral Word Association Test (COWAT) の成績が健常者と比較して低下していたと報告した。今回の我々の調査では若年群において、寛解直後と比較して長期寛解により Stroop test の成績の有意な改善と VFT の改善の傾向がみられた。上記の先行研究と合わせて考えると、Stroop test の成績は長期寛解により改善するものの、健常者レベルまでは回復せず、その機能障害が長期に残存するのかもしれない。一方高齢群ではこれらの検査で、そうした成績の改善がみられず、寛解直後からの機能障害が同程度で残存されていた。これらのことから若年群の遂行機能障害はある程度可逆性をもった機能的な障害で、高齢群でみられた障害にはより脳器質的な要因が関係している可能性が示唆されたものと思われた。

記憶機能に関しては、若年群において論理記憶および言語性対連合といった言語性記憶

が、即時再生、遅延再生ともに長期寛解により寛解直後より改善していた。一方、老年群においてはこれら言語性記憶のみならず、視覚性記憶も寛解直後より障害されていたが、この障害がうつ症状の長期寛解によっても改善されなかった。うつ病では記憶や学習に関係する海馬の体積減少や海馬領域の神経新生の障害が知られているが、今回の結果からはこうした記憶機能障害も若年うつ病ではある程度回復可能な機能的な障害であるのに対し、高齢うつ病では海馬領域に器質的障害が存在することを示唆するものかもしれない。

今回の結果では若年うつ病では寛解直後にみられた遂行機能障害や記憶機能障害が長期寛解により改善していたのに対し、高齢うつ病ではその改善がみられなかった。こうしたことから若年うつ病における認知機能障害はうつ症状に依存するものではないが、長期寛解により改善し得る可逆的な機能障害であるのに対し、高齢うつ病にみられる認知機能障害は前頭葉や海馬領域の器質的障害が関与する非可逆的な機能障害であるかもしれない。今回は全例 2 回目の検査であり、今回若年群にみられた認知機能の改善には検査の繰り返しによる学習効果が影響している可能性も否定できない。今後は健常者に対する追跡調査も実施し、両者の比較をする予定である。さらに薬剤や脳血管病変との関連も検討したいと思う。

#### E. 結論

若年うつ病の寛解 2 年後の遂行機能や記憶機能は、寛解直後と比較して向上していたが、高齢うつ病患者では遂行機能や記憶機能の改善はみられなかった。若年うつ病にみられた長期寛解による performance の向上には検査の繰り返しによる学習効果の影響も考えられるが、うつ症状の改善と認知機能の改善には時間差がある可能性が考えられた。一方高齢うつ病患者における認知機能障害にはより前頭葉や海馬領域の器質的要因が関係しているのかもしれない。今後は症例数を増やすと同時に健常者にも追試を行い、さらに薬剤や脳血管性病変との関連を検討する予定である。

#### F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakano Y, Baba H, Maeshima H, Kitajima A, Sakai Y, Baba K, Suzuki T, Mimura M, Arai H. Executive dysfunction in medicated, remitted state of major depression. J Affect Disord. 111; 46-51, 2008.

2. 学会発表

1. 馬場元. うつ病から認知症への移行ならびにその介入に関する研究. 第22回 老年期痴呆研究会 2008年7月26日 東京
2. 前嶋仁, 馬場元, 中野祥行, 鈴木利人, 新井平伊. 老年期うつ病と認知機能. Research for Organic Depression. 2008年3月8日. 東京
3. 前嶋仁, 馬場元, 中野祥行, 北島明佳, 鈴木利人, 新井平伊. 寛解期うつ病患者における記憶機能の縦断的調査 ～うつ病は認知症の危険因子か?～. 日本うつ病学会総会 (2008) 福岡
4. 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: 第2報. 日本うつ病学会総会 (2008) 福岡

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

慈恵病院・慈恵精神医学研究所 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。古いホルマリン固定パラフィン標本を用いた、以前の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。しかしホルマリン固定パラフィン標本では検討できる分子が限られるため、本研究では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を用いて、様々な炎症関連分子の発現を組織定量的に検討した。しかしうつ例と対照高齢者との間に明らかな差を見いだすことはできなかった。

#### A. 研究目的

高齢者のうつ病は若年者のうつ病と異なり、脳の器質的な病変が背景にあることが多い。以前行った古いホルマリン固定パラフィン標本を対象とした組織病理学的研究で、虚血や様々な器質的病変に伴う慢性炎症反応の関与を示唆するミクログリア活性化所見が得られた。しかし、これらの標本では解析できる分子がきわめて限られることから、主として米国 brain bank から得たパラフォルムアルデヒド(PFA)固定凍結浮遊切片を用いて、高齢者うつ群と高齢対照者群との間で、多様な炎症関連分子の発現を、免疫組織化学と組織定量を用いて比較した。

#### B. 研究方法

対象は都立松沢病院で本研究期間中に剖検となった高齢者うつ病1例、および組織定量的な解析を目的に米国 Sun Health Research Institute (AZ)の脳 bank から提供を受けた、高齢者うつ5例と対照5例である。Sun Health 標本セットは、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例の前頭葉上～中前頭回の50 $\mu$ m厚浮遊切片である。松沢病院で剖検となったうつ例は東京都精神医学総合研究所に保管されている同病院の他の症例と高感度免疫組織化学的染色を用いて比較するため、PFA短時間固定の後、30 $\mu$ m厚浮遊凍結切片を作成した。多数の切片を使用できる本症例を用いて、Sun Health 標本セットでの検討の

ための定性的な評価を行う予備的な検討を行った。

前年度に Sun Health 標本セットで調べた CD11a, C4d, 25F9, COX-1, ICAM-1 に加え、CD11b, CD11c, Iba-1, CD68, COX-2, coagulation factor IIIa, glucose transporter \*5, progranulin, iNOS, CD62P, CD40, CD44 について免疫組織化学染色を行った。対照例として非精神・神経疾患例、および陽性コントロールとしてアルツハイマー病や虚血病変、微小脳膿瘍を合併する症例を用いて定性的な比較・観察を行った。

つぎに、上記の予備的免疫組織化学的解析結果から、比較的安定して染色可能な（死後変化や固定条件等の影響を受けにくい）分子として、CD68, progranulin を選び、Sun Health のうつ・対照標本セットの組織定量的な解析を行った。染色標本の一定の部位を選び、各症例・染色とも多数視野について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。統計解析には StatMate III $\oplus$ を使用した。

#### （倫理面への配慮）

平成13年以前の古い解剖例については、匿名化により個人情報保護を図った。米国 Sun Health Research Institute の症例はすべて brain donation に対する生前合意を得ており、標本の外部施設への提供は、同 Institute の倫理委員会の承認を得ている。また都立松沢病院で平成13年以降に解剖された剖検脳標本については、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針を日本神経病理学会が推奨する形で準用した。剖検時に文書で研究に使用する旨の同意を得ることができた症例のみを