

臨床的に長期間寛解が維持された 47 例(男性 21 例, 女性 26 例)に対し, 同様の神経心理検査を施行した。再検査までの日数は 732.4 ± 300.0 (mean \pm S.D.) 日であった。

寛解直後を T0, 再検査時を 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と若年群に分けて分析した (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

年齢, 教育年数, 推定 IQ に患者群と健康者群で有意な差はなかったが, 健康者群では有意に女性が多かった。

WCST の達成カテゴリ数 ($F=10.3$, $p<0.05$), 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 VFT ($F=15.4$, $p<0.001$) 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 VFT ($F=3.9$, $p<0.05$) 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。VFT 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血管病変の有無が VFT の結果に影響を与えていた ($\beta=-0.26$, $p<0.05$)。

一方追跡調査において, 若年群 31 例の年齢は 45.3 ± 8.7 歳で, 高齢群 16 例は 70.4

± 4.2 歳であった (mean \pm S.D.)。教育年数は若年群が 13.1 ± 1.8 年, 高齢群が 10.8 ± 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, 遅延再生が統計学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 の結果は高齢群では performance の低下がみられたが, うつ病寛解期と健康者とは過去の報告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康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, これも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 の成績は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成績が低下していた。さらにこの成績に血管病変の有無が影響を与えることが示された。高齢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を中心とした血管性病変が多く、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 の成績低下は白質を中心とした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。

追跡調査における遂行機能に関して、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性の障害で、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る。

追跡調査における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。こ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性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。

今回の追跡調査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可能性が、あらためて示唆されたものと思われる。

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、白質を中心とした血管性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。また追跡調査により、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可能性があらためて示唆された。これらの結果は高齢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、今後さらなる調査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. 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. Baba H, Fujikura Y, Maeshima H, Nakano Y, Baba K, Suzuki T, Arai H. Seven cases with late-life depression who responded a Cilostazol combination therapy. ICGP (2006) Hiroshima
2. Nakano Y, Baba H, Maeshima H, Sakai Y, Suzuki T, Arai H. Organic factors may affect cognitive function in remitted state and clinical features in depression. ICGP (2006), Hiroshima.
3. Maeshima H, Baba H, Nakano Y, Sakai Y, Suzuki T, Arai H. Memory disturbance during remitted phase in patients with late-life depression. ICGP (2006) Hiroshima
4. Baba K, Baba H, Noguchi I, Suzuki T, Arai H. Executive Functions in

Remitted Phase of Late Life Depression. ICGP (2006) Hiroshima

5. 中野祥行, 馬場元, 前嶋仁, 酒井佳永, 鈴木利人, 新井平伊. 気分障害の認知機能に関する研究: 第2報. 日本うつ病学会総会 (2006) 東京
6. 藤倉由季, 馬場元, 鈴木利人, 新井平伊. 老年期うつ病に対する Cilostazol の効果 - 奏功した3症例による検討 -. 日本うつ病学会総会 (2006) 東京
7. 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
8. 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
9. Nakano Y, Baba H, Maeshima H, Sakai Y, Suzuki T, Mimura M, Arai H. Differences of Executive Dysfunction in Remitted State of Young and Elderly Major Depressive Disorders - Juntendo University Mood disorder Projects; JUMP. IPA (2007). Osaka
10. 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
11. 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
12. 馬場元, 久保田由季, 鈴木利人, 新井平伊. 老年期うつ病に対する Cilostazol-augmented Therapy の効果: 7症例の経験から. 日本うつ病学会総会 (2007) 札幌

13. 馬場奏子、馬場元、野口岩秀、新井礼子、鈴木利人、三村將、新井平伊。老年期うつ病の寛解期における遂行機能障害。日本うつ病学会総会（2007）札幌
14. 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
15. 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
16. 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
17. 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

6. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

うつ病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、器質的要因の関与があると考えられている。ホルマリン固定パラフィン標本を用いた病理学的研究において、高齢発症のうつ病患者前頭葉のミクログリア活性化が認められ、慢性炎症の存在が示唆された。そこで多様な炎症関連因子の発現を検出することが可能なパラフォルムアルデヒド固定凍結浮遊標本を用いて、うつ病高齢者の剖検脳解析を行った。本研究期間中に剖検になった1例と、海外脳バンクから提供を受けた5例の前頭葉皮質・白質を対照高齢者の同じ部位と組織定量により比較したが、ミクログリア、アストロサイト、血管内皮細胞等における様々な炎症性因子の発現に、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。以前のホルマリン固定パラフィン標本を用いた組織病理学的研究により、動脈硬化や虚血性変化がある例、およびそれらの病変がない例のいずれにおいても、高齢者「うつ」群では軽度のミクログリア活性化が認められ、高齢者「うつ」の病理学的背景として前頭葉における低レベルの、しかし遷延する炎症反応の存在が示唆された。そこで本研究では、通常のホルマリン固定病理標本より多くの分子を染色・観察できるパラフォルムアルデヒド(PFA)固定凍結浮遊標本を用いて、高齢者「うつ」症例前頭葉の炎症性因子発現について詳細な解析を試みた。

B. 研究方法

以前の研究で、前頭葉白質ミクログリアの活性化が認められたホルマリン固定パラフィン標本セットは、東京都精神医学総合研究所に保存されている剖検標本中、退行期～老年期発症のうつ病のうち脳血管障害病変・細動脈壁肥厚を伴わない群6例、伴う群5例および正常対照高齢者群5例の前頭前野である。

高感度免疫組織化学染色による多数の炎症性因子の解析に用いることができたのは、都立松沢病院で本研究期間中に剖検となった高齢発症の「うつ」病1例と、炎症性因子発現亢進を示す陽性対照例としてアルツハイマー病、脳虚血病変や死戦期の敗血症による微小膿瘍等を伴う例、それに非精神神経疾患対照例などの、PFA短時間固定、30 μ m厚の凍結切片、および複数例による組織定量的な解析

を目的として米国 Sun Health Research Institute (AZ)の brain bank から提供を受けた、高齢者「うつ」5例と、年齢を一致させた対照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、ならびに年齢・MMSEスコア・Braakの神経原線維変化ステージを一致させた対照高齢者の前頭葉上～中前頭回の50 μ m厚浮遊切片である。

ホルマリン固定パラフィン標本セットは型どおりに脱パラの後、Iba-1, CD68, Leukocyte common antigen (LCA: CD45)による免疫組織化学染色を行った。

PFA短時間固定標本セットは、都立松沢病院の「うつ」例と、比較に用いた東京都精神医学総合研究所に保管されている症例についてはLCA(CD45), CD11a, CD11b, CD11c, Iba-1, CD68, 25F9, COX-1, coagulation factor IIIa, glucose transporter-5, progranulin (以上、主としてミクログリアが発現), ICAM-1, CD44 (以上、アストロサイトと血管内皮細胞が発現), CD40 (ミクログリアと血管内皮細胞が発現), CD62P (血小板と血管内皮細胞が発現), iNOS, COX-2 (以上、神経細胞と血管内皮細胞が発現), C4d, Olig-2 (以上、オリゴデンドロサイトが発現)に対する抗体で免疫組織化学染色を行い、定性的な評価を加えた。

Sun Health 標本セットでの検討のためには、上記定性的な評価の過程で比較的安定して染色されることが示された(死後変化や固定条件等の影響を受けにくい)分子の、C4d, CD11a, CD68, 25F9, COX-1, progranulin,

ICAM-1 を選んで免疫染色を行い、各症例ともほぼ同じ部位を選んで、陽性細胞の計数を行うか (C4d 陽性オリゴデンドロサイト)、あるいは多数視野について高解像度デジタル顕微鏡カメラによる撮影を行い、得られた画像について、NIH image を用いて定量的解析を加えた。CD11a については脳実質のミクログリア活性化を定性的に評価するとともに、collagen IV による血管壁の対染色を加えて、血管壁に付着したり血管外に浸潤したりした CD11a 陽性白血球を定量的に解析した。なお、脳における慢性炎症レベルへの影響があると考えられるアミロイドβ蛋白質の蓄積を免疫組織染色で評価した。

(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 (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。また都立松沢病院で平成 13 年以降に剖検となった例については倫理指針にもとづいて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用い、都立松沢病院と、東京都精神医学総合研究所のそれぞれの倫理委員会において研究計画の承認を得た。以上より、本研究は倫理的に十分な配慮のもとに実施されたと判断される。

C. 研究結果

(1) ホルマリン固定パラフィン標本セット：前頭葉白質において 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。一方、Iba-1 および CD68 免疫染色による前頭葉白質のミクログリア活性化の組織定量では、「うつ」症例のミクログリアはこれらの因子の発現が有意に亢進していた。「うつ」群の中では脳血管障害・動脈壁肥厚の有無による白質ミクログリアの活性化の違いは明瞭ではなかった。

(2) PFA 固定凍結標本セット：本研究期間中に都立松沢病院で剖検となり、多数の抗体の予備的検討の対象とした「うつ」症例は、死亡の前年から抑うつとなり精神科において治療を受けていたが、胃がんにより死亡し

た 70 歳の女性である。神経細胞、アストロサイト、ミクログリア、血管内皮細胞等において、非感染性の慢性炎症性病変においても発現亢進が認められている LCA(CD45)、CD11a、CD11b、CD11c、Iba-1、CD68、25F9、COX-1、HLA-DR、progranulin、coagulation factor IIIa、glucose transporter-5、ICAM-1、CD44、CD40、CD62P、iNOS、COX-2、C4d、について、前頭葉皮質と白質において定性的な評価を行い、対照例とで比較した。しかし本症例では、これらの分子のうち、脳病変を欠く症例と比較して発現増加が明らかな因子を見いだすことはできなかった。

ついで、上記の検討過程で最も安定して染色された (すなわち死後変化や死戦期の低酸素症、虚血などによる組織の変性による染色性の低下などが少なかった) 25F9、COX-1、ICAM-1、CD11a、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 (「うつ」5 例と対照高齢者 5 例の前頭葉の皮質、および白質) において組織定量した。これら分子の発現量、および (最も染色が安定しており、ミクログリアの活性を正確に反映すると考えられた) CD68 発現亢進に対する各分子の相対的な発現量の変化を比較し、さらにその CD68 に対する相対的变化を、各症例のアミロイドβ蛋白質の蓄積の程度を考慮にいった形で比較した。しかし、これらの検討において、「うつ」、対照両群間で有意な差は認められなかった。次にこれらの組織定量の結果を偏差値に変換して値の範囲を揃え、各分子相互の発現亢進のパターンを症例ごとにグラフ化して「うつ」、対照両群で比較したが、皮質、白質とも、それぞれの群に共通する一定の特徴を見いだすことはできなかった。また前頭葉皮質における C4d 陽性オリゴデンドログリアの計数をおこなったが「うつ」群における増加は認められなかった。皮質および白質における Olig2 陽性オリゴデンドログリア数については、「うつ」5 例中 2 例は染色が不良で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、例数が少なく統計学的に有意な結果にはならなかった。なお「うつ」群の中に 1 例、前頭葉皮質の錐体細胞の COX-1 発現が亢進していた症例があったが、この所見の意味は現時点では不明である。

D. 考察

本研究は、以前、東京都精神医学総合研究所所蔵の古いホルマリン固定パラフィン標本を用いた神経病理学的解析を、抗 Iba-1 抗体を使用して行い、高齢発症の「うつ」群の前頭葉の皮質・白質において、年齢を一致させた対照群に比べてミクログリアの活性が亢進しているとの結果が得られたことにもとづいて、より多くの炎症マーカーを高齢「うつ」・対照の両群間で比較する目的で行われた。

剖検脳の免疫組織化学染色においては、古典的なホルマリン固定パラフィン標本作製の過程で、多くの抗原エピトープが立体構造の変形や周囲の分子との結合、その他により変化し、染色性が失われる。この問題をできるだけ回避するために、氷冷パラフォルムアルデヒド(PFA)短時間固定、凍結浮遊切片を用いた免疫組織化学染色が使用され、この方法により多数の分子の染色が可能になる。しかし、この場合は、剖検脳を最初からこのプロトコロールで処理しておく必要があるため、以前に蓄積された標本に遡って研究を行うことはできない。

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症例の剖検は1例のみであった。そこで、一定数以上の症例を対象に定量的な検討するために海外 brain bank からの標本提供を受けた。しかし、高齢者うつ症例とされていた中に、双極性障害や若年発症のうつ症例が、brain bank の剖検記録には十分記載されていなかった等の理由により、含まれてしまった可能性は否定できない。しかし、1例ではあるが、臨床経過が明らかな都立松沢病院の症例で、かつ最適化された標本作製プロトコロールが適用された標本においても、脳病変を伴わない対照高齢者との差が明確ではなかったことを考慮すると、高齢発症「うつ」例の前頭葉における慢性炎症性変化の検出には、相当数を集積した上での比較、あるいは、生化学等他の手法を併用した解析が必要であるかも知れない。

すなわち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がノイズとなって混じるため、原疾患における違いがわずかな場合は検出がきわめて難しくなる可能性がある。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、同様の炎症性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、本研究ではそれを実施できるほどの症例数を確保することはできなかった。

E. 結論

高齢発症の「うつ」症例の前頭葉皮質および白質において、ミクログリアの活性化を中心とする低レベルの慢性炎症性変化が生じている可能性があり、それについてさらに詳細な検討を行ったが、十分な結論を導き出せるだけの結果は得られなかった。この問題に関する研究には、今後も継続して長期的に剖検脳標本の集積をしてゆく必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Iritani S, Tsuchiya K, Arai T, Akiyama H, Ikeda K. (2008) An atypical autopsy case of Lewy body disease with clinically diagnosed major depression. *Neuropathol* 28:652-659
2. Oda T, Tsuchiya K, Arai T, Togo T, Uchikado H, de Silva R, Lees A, Akiyama H, Haga C, Ikeda K, Kato M, Kato Y, Hara T, Onaya M, Hori K, Teramoto H, Tominaga I (2007) Pick's disease with Pick bodies: an autopsy case showing degeneration of the pontine nucleus, dentate nucleus, Clarke's column, and lower motor neuron. *Neuropathology* 27:81-89.
3. Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Ikeda K, Nonaka T, Mori H, Mann D, Tsuchiya K, Yoshida M, Hashizume Y, Oda T (2006) TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun* 351:602-611.
4. Iritani S, Tohgi M, Arai T, Ikeda K (2006) Immunohistochemical study of the serotonergic system in animal model of the mood disorder. *Exp Neurol* 201: 60-65
5. 長谷川成人, 新井哲明, 野中隆, 亀谷富由樹, 秋山治彦, 池田研二 (2006) 前頭側頭型認知症の生化学. *Dementia Japan* 20:36-45.

2. 学会発表

1. Arai T, Hasegawa M, Nonaka T, Kametani F, Ikeda K, Yoshida M, Hashizume Y, Beach TG, Buratti E, Baralle F, Morita M, Nakano I, Oda T, Tsuchiya K, Akiyama H (2008) Accumulation of phosphorylated TDP-43 in neurodegenerative disorders. International Conference on Alzheimer's Disease 2008, Chicago, USA [2008/07/28]
 2. 新井哲明, 長谷川成人, 秋山治彦, 野中隆, 亀谷富由樹, 池田研二, 近藤ひろみ, 下村洋子, 羽賀千恵, 土谷邦秋, 吉田眞理, 橋詰良夫, 新里和弘, 大島健一, 森田光哉, 中野今治 (2008) 神経変性疾患におけるリン酸化 TDP-43 の蓄積. 第49回日本神経病理学会総会学術研究会, 東京 [2008/05/20]
 3. 新井哲明, 長谷川成人, 秋山治彦, 野中隆, 亀谷富由樹, 池田研二, 近藤ひろみ, 下村洋子, 羽賀千恵, 土谷邦秋, 吉田眞理, 橋詰良夫, 新里和弘, 大島健一, 森田光哉, 中野今治 (2008) 患者脳に蓄積した TDP-43 のリン酸化部位に関する検討. 第49回日本神経病理学会総会学術研究会, 東京 [2008/05/20]
 4. 長谷川成人, 新井哲明, 野中隆, 亀谷富由樹, 吉田眞理, 橋詰良夫, 土屋邦秋, 森啓, 秋山治彦, 池田研二 (2007) FTLT, ALS における TDP-43 の蓄積. 平成 19 年度文科省科学研究費補助金「特定領域研究」第5領域「病態脳」夏のワークショップ (班会議), 札幌 [2007/08/21]
 5. 新井哲明, 長谷川成人, 秋山治彦, 池田研二, 野中隆, 森啓, Mann D, 土谷邦秋, 吉田眞理, 橋詰良夫, 織田辰郎 (2007) 前頭側頭葉変性症と筋萎縮性側索硬化症における TDP-43 の蓄積. 第48回日本神経学会総会, 名古屋 [2007/05/17]
 6. 新井哲明, 長谷川成人, 秋山治彦, 池田研二, 新里和弘, 土屋邦秋, 近藤ひろみ, 下村洋子, 羽賀千恵, 織田辰郎 (2007) タウ陰性ユビキチン陽性封入体を伴う前頭側頭葉変性症におけるプログリンニューリンおよび TDP-43 の免疫組織化学的検討. 第48回日本神経病理学会総会学術研究会, 東京 [2007/05/31]
 7. Ikeda K, Ishizu H, Terada S, Akiyama H, Kondo H, Haga C, Makifuchi T, Iritani S. Neuropathological study of late-life depression. Neuropathology 26:A41, 2006
- G. 知的所有権の取得情報
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

高齢初発うつ病の脳画像学的解析と薬物治療反応性に関する研究

分担研究者 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

研究要旨: 気分障害の予測・診断・治療に貢献可能な生物学的指標の同定を試みた。気分障害との関連が示唆されているグルココルチコイド受容体(GR)の2つのアイソフォーム(GR α 、 β)の発現量比を測定したところ、気分障害患者における GR α mRNA 発現量の有意な低下と、GR 遺伝子の選択的スプライシング異常が示唆された。事実、気分障害患者群におけるスプライシング制御因子 SRp20 mRNA 発現量とその標的遺伝子(CGRP)は健常者群に比し有意に変化していた。さらに、GR の標的遺伝子として栄養因子群や細胞接着因子群の発現量を検討した結果、気分障害患者において GDNF や NCAM、LI などの発現量異常が認められた。以上の結果から、気分障害患者における選択的スプライシング異常とGRを介した遺伝子発現調節異常が示唆された。また、薬物治療抵抗群と反応群における様々な遺伝子発現量を検討したところ、CGRP と LI が薬物治療抵抗性の生物学的指標となり得る可能性が示唆された。さらに本研究では、高齢初発うつ病の発症脆弱性に脳循環の障害が疑われていることから、高齢初発うつ病患者における血流改善薬の効果を検討する端緒として、気分障害患者における血小板活性化因子発現量を測定した。

A. 研究目的

気分障害患者で視床下部—下垂体—副腎系 (HPA 系) 過活動を示唆する報告が多数なされており、気分障害の病態形成に HPA 系異常の関与が注目されてきた。HPA 系過活動の機序は不明であるが、その一つとしてグルココルチコイド受容体(GR)を介するネガティブフィードバック機構の低下が要因である可能性が指摘されている。

GR には同一遺伝子からの選択的スプライシングによる、 α 、 β 2種類の アイソフォームが存在し、従来気分障害で検討されてきたのは専ら GR α である。GR β についてはその機能も不明な点が多く、ほとんど検討されてこなかった。以前から我々は、気分障害における GR 機能解析研究に取り組んでおり、その端緒として、末梢白血球における GR α 、 β mRNA の発現量を解析してきた。その結果、単極性・双極性気分障害患者における GR α mRNA 発現量は、病状(うつ病相・寛解期)に関係なく、健常者群に比べ有意に低下していたことから、GR α mRNA 発現量の低下は、気分障害の trait marker であることが示唆された。

さらに、健常者群でみられた GR α と β mRNA 発現量の逆相関が、気分障害患者群では認められなかったことから、GR 遺伝子の選択的スプライシング機構異常が気分障害の病態に関与していることが示唆された。

本研究課題では、1) 気分障害患者における GR 遺伝子の選択的スプライシング異常に着目し、GR 遺伝子の選択的スプライシングに関与していることが示唆されている SR タンパク遺伝子群とその標的遺伝子発現量を検討した。また、2) 気分障害患者におけるGRを介した遺伝子発現調節機能を検討することを目的として、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遺伝子群の中で、GRによって発現制御されていることが示唆されている栄養因子群や細胞接着因子群の発現量を検討した。さらに、3) 薬物治療反応群と非反応群における様々な遺伝子群発現量を比較検討した。

一方、若年初発うつ病と高齢初発うつ病とは発症脆弱性を形成する因子が一部異なると想定されている。前者では主に神経可塑性

の異常、後者では微小脳血液循環の異常が関与するものと想定されている。そこで、4) 発症脆弱性の基盤が異なると考えられる高齢初発うつ病の患者に対する抗血小板薬の臨床効果を検討する端緒として、健常者および気分障害患者末梢血における血小板活性化因子発現量を検討した。

B. 研究方法

研究1,2：遺伝子発現量測定

健常者28名、大うつ病性障害患者（抑うつ状態）19名、双極性障害患者（抑うつ状態）9名に対して検討を行った。診断はDSM-IVに基づいて行い、抑うつ状態の評価としてハミルトンうつ病評価尺度を用いた。採取した血液10mlからcDNAを合成し、定量的リアルタイムPCR法に供した。

研究3：難治例での検討

イミプラミン換算で150mg/日以上抗うつ薬を8週間以上投与したが改善せずECT施行により軽快した症例を難治例と定義した。精神症状が重度であるため早急にECTを導入した症例、及び副作用のため薬剤による治療が困難であったためECTを導入した症例は除いた。薬物治療反応群25名、薬物治療非反応群9名で検討した。

研究4：血小板活性化因子測定

健常者5名、大うつ病性障害患者（抑うつ状態）4名に対して検討を行った。血液より血漿を調整後、血小板活性化のマーカー因子、P-selectin、 β -TG、PF4量をELISA法により検討した。

（倫理面への配慮）

本研究の目的、方法を文書と口頭で十分に説明し、同意の得られた者のみを研究対象者とした。研究過程で外部に個人が特定されないよう配慮することを説明し、同意の署名を

得た。

C. 研究結果

研究1：気分障害患者におけるGR遺伝子の選択的スプライシング異常の検討

気分障害患者の末梢白血球におけるSR蛋白質遺伝子群(SRp20, SRp30c, SC35, SRp40, SRp46, SRp54, SRp55, SRp75, ASF/SF2, 9G8)のmRNA発現量について検討したところ、双極性障害患者群うつ状態におけるSRp20 mRNA発現量は健常者群に比し有意に高い値を示し、この変化は寛解期でも認められた。その他のSR蛋白質遺伝子mRNAの発現量については、有意な差を認めなかった。さらに、SRp20の標的遺伝子であることが示されているCGRP mRNA発現量を測定したところ、大うつ病性障害患者群は健常者群に比べ有意にその発現量が低下していた。

研究2：気分障害患者におけるGR標的遺伝子群発現量の検討

細胞接着因子群について、気分障害患者（うつ病相）末梢白血球におけるNCAM mRNA発現量は、健常群に比べ有意に低下していた。一方、寛解期では有意な差は認められなかった。L1 mRNA発現量に関して、うつ病相の双極性障害患者群は健常群に比べ有意に増加していた。一方、寛解期では有意な差は認められなかった。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。大うつ病性障害患者では細胞接着遺伝子群の発現量に何ら差を認めなかった。

栄養因子群に関して、うつ病相の大うつ病性障害患者における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。一方、寛解期では有意な差は認

められなかった。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。

研究3：薬物治療抵抗群と反応群における遺伝子発現量の比較

薬物治療抵抗群における CGRP mRNA 発現量は薬物治療反応群に比べて有意に低下していた。さらに、薬物治療抵抗群における LI mRNA 発現量は薬物治療反応群に比べて有意に低下していた。

研究4：血小板活性化因子測定

大うつ病性障害患者血漿中の P-selectin、 β -TG、PF4 量はいずれも健常者に比べ低い傾向であった。

D. 考察

1) 気分障害患者における選択的スプライシング異常

我々は抑うつ状態にある気分障害患者から採取した末梢白血球を用いて SR 蛋白質遺伝子群 10 種類の mRNA 発現量を検討した。その結果、SRp20 mRNA の発現量は双極性障害患者群において有意に増加していた。更に、寛解状態にある気分障害患者から採取した末梢白血球を用いて解析したところ、同様の結果を得た。この結果から、双極性障害患者末梢白血球における SRp20 mRNA 発現量の上昇は trait 的な変化であると考えられ、これは GR α mRNA の発現変化と一致していた。

SRp20 を介した選択的スプライシングによってカルシトニン遺伝子(CT)から産出される CGRP の発現が変化している可能性が考えられる。カルシトニン遺伝子は選択的スプライシングによって CT と CGRP 2つのアイソフォームが産生される。げっ歯類の中核や末梢に CGRP を投与すると、血中のコルチコステ

ロン量が増加したり、食事摂取量が減少したりするというストレス負荷状態、抑うつ状態に類似した状態を呈することが報告されている。興味深いことに、大うつ病性障害患者の髄液において CGRP 濃度の増加が報告されている。更に大うつ病性障害患者の髄液において CT のみが減少し、CGRP が変化していないため CGRP/CT 比の割合が増加していることが報告されている。これらの知見は、大うつ病性障害患者における CGRP mRNA の選択的スプライシングの異常を強く示唆しており、SRp20 を介した選択的スプライシングの異常が気分障害の病態生理に関連しているかもしれないとする我々の仮説を強く支持している。

2) 気分障害患者におけるGR標的遺伝子発現量の異常

栄養因子群は細胞の生存・遊走などに関与していることが明らかとなっている。中枢ではその機能解析が精力的に行われ、各栄養因子群の分子機能が解明されつつある。しかしながら、末梢白血球におけるそれらの機能は未だ不明であり、今後の検討課題である。

これまでに、気分障害患者末梢白血球において酸化ストレスの増加、アポトーシスの増加が報告されている。興味深いことに、GDNF は酸化ストレスによるアポトーシスを抑制することが知られている。従って、我々が見出した気分障害患者における GDNF の発現低下は、アポトーシスなどの増加と関連があるのかもしれない。

細胞接着因子群の NCAM 遺伝子は GR により発現制御を受けることが示唆されていることから、大うつ病性障害患者群における NCAM mRNA 発現量低下は、GR の機能異常によるものであることが示唆された。また、最近の研究から、LI 遺伝子の発現は転写抑制

因子 REST/NRSF によって制御されている可能性があり、GR 以外の転写因子にも着目し、検討を重ねる必要がある。

3) 薬物治療抵抗性について

薬物治療非反応群における CGRP と L1 mRNA 発現量の有意な低下は、難治例におけるバイオリジカルマーカーとなる可能性が示唆された。しかし、サンプル数が少ないため今後はさらに検討を重ねることで、マーカーとしての妥当性を評価していく必要がある。

4) 気分障害患者における血小板活性化因子レベルについて

うつ病性患者における血小板活性化レベルが健常群に比べ低いという今回の結果は、過去の報告と逆であった。これは、今回用いた患者が SSRI を服用していること、寛解状態に近い状態のためだと考えられる。今後、未服薬の患者や薬物治療抵抗性うつ病患者を対象を広げて検討する必要があると思われる。

E. 結論

本研究により、気分障害患者における SRp20 を介した選択的スプライシング異常が示唆された。今後、SRp20 の標的遺伝子発現量の検討や、新たな標的遺伝子の同定、GR 遺伝子選択的スプライシングとの関連、及び SRp20 による選択的スプライシング機構の分子メカニズムを解析していくことで、選択的スプライシング機構異常を介した気分障害の病態の一端が明らかになることが期待される。

また、気分障害患者において数種類の GR の標的遺伝子発現量の異常が認められた。これは、気分障害患者における GR の機能異常を強く示唆するものであり、今後はタンパク

レベルでの検討も含め、バイオリジカルマーカーとしての妥当性を評価していく必要があると思われる。

さらに、薬物治療非反応群における CGRP、L1 mRNA 発現量の有意な低下は、難治例におけるバイオリジカルマーカーとなる可能性が示唆された。今後はより大規模な調査を行うとともに、CGRP、L1 mRNA 発現量低下の分子メカニズムを検討することで、気分障害の病態の一端を解明できることが期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Watanuki T, Funato H, Uchida S, Matsubara T, Kobayashi A, Wakabayashi Y, Otsuki K, Nishida A, Watanabe Y.: Increased expression of splicing factor SRp20 mRNA in bipolar disorder patients. *Journal of Affective Disorders*, 110: 62-69, 2008
2. Otsuki K, Uchida S, Watanuki T, Wakabayashi Y, Matsubara T, Fujimoto M, Funato H, and Watanabe Y.: Altered expression of neurotrophic factors in patients with major depression. *Journal of psychiatric research*, 1145-1153, 2008
3. Wakabayashi Y, Uchida S, Funato H, Matsubara T, Watanuki T, Otsuki K, Fujimoto M, Nishida A, Watanabe Y.: State-dependent changes in the expression levels of NCAM-140 and L1 in the peripheral blood cells of bipolar disorders, but not in the major depressive disorders. *Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry* 32, 1199-11205, 2008
4. Fujimoto M, Uchida S, Watanuki T,

Wakabayashi Y, Otsuki K, Matsubara T, Suetsugi M, Funato H, Watanabe Y.: Reduced expression of glyoxalase-1 mRNA in mood disorder patients. Neuroscience letters 438: 196-199, 2008

5. Matsubara T, Funato H, Kobayashi A, Nobumoto M, Watanabe Y.: Reduced glucocorticoid receptor alpha expression in mood disorder patients and first-degree relatives. Biological Psychiatry 59, 689-695, 2006

2. 学会発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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的研究

分担研究者 白尾 智明

群馬大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨：本研究は神経の発生・移動・分化に関連するうつ病の脳器質性発症脆弱性の病態生理の解明と修復の可能性を動物や細胞レベルでの脳科学的基礎研究で探求する。成熟脳における新生神経細胞や移動神経細胞の同定法を開発するとともに、神経軸索成長の制御機構を解明し、神経新生の全体像を明らかにし、発達過程の異常がもたらす「うつ病」発症要因としての脳の脆弱性を検討する。

A. 研究目的

本研究は神経の発生・移動・分化に関連するうつ病の脳器質性発症脆弱性の病態生理の解明と修復の可能性を動物や細胞レベルでの脳科学的基礎研究で探求し、その成果を死後脳の免疫組織学的解析により検証することを目的とする。さらに、本研究成果をうつ病の診断、治療に応用することを目指す。

うつ病では病態の基盤となる脳の脆弱性の一つとして脳の組織構築に異常があることが推測されている。脳の組織構築以上の原因としては、一つには、神経細胞の移動に異常が考えられる。しかしヒトでは移動細胞を直接同定する方法がまだないので、細胞移動異常は直接は確認されていない。移動細胞を同定する方法としては、実験動物ではBRdU投与などの方法が開発されているが、これらの侵襲的方法をヒトに応用することはできない。また、Ki67抗体を用いた同定法は分裂細胞を同定することはできるが、移動細胞を同定することはできない。このように、死後脳で移動神経細胞を同定する良い方法は、現在までのところ開発されていなかった。そこで、我々は二種類のドレブリン抗体を用いることにより成熟脳で移動神経細胞を同定する方法を開発する。

一方、脳の組織構築異常の原因として、神経回路構築の異常が考えられる。発生過程における神経細胞は脳室下帯で分裂・増殖し、その後その細胞本来場所に移動する。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構造は神経軸索の末端に形成される成長円錐

である。そこで我々は、軸索の成長メカニズムを解明するために、初代培養神経細胞を用いて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明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

8週齢以上の雄SD系ラットを4%パラフォルムアルデヒドで灌流固定し、脳を包埋凍結して、10 μ mの薄切片を作成し、ドレブリンA（成人型）特異的ポリクロナール抗体DAS2とドレブリンAとE（胎児型）の両方を認識するモノクロナール抗体M2F6をそれぞれ一次抗体として免疫組織化学染色を行った。陽性シグナルはABCキットとDAB発色によって検出した。また、DAS2とM2F6を組み合わせる二重蛍光染色を行った。ドレブリンEのみを可視化するために、DAS2の画像をM2F6の画像から引いた。0DIVと21DIVの海馬神経細胞の混合培養で、ドレブリンE可視化の妥当性を評価した。さらに、細胞増殖のマーカーKi67、神経前駆細胞のマーカーPSA-NCAMやアストロサイトのマーカーGFAPとM2F6との二重蛍光染色を行った。三重蛍光染色はDoublecortinのヤギポリクロナール抗体とM2F6とDAS2を用いて行った。RMSにおけるドレブリン陽性細胞の移動を観察するために、右側の嗅球摘出手術を施行し、M2F6とDAS2の二重染色を行った。その後、ドレブリンE+A-細胞の数を定量し、両側の比較に対し、t検定を行った。

次に、初代培養海馬神経細胞を作成した。まず、妊娠18日目のラットを深麻酔後、胎

仔を取り出し、氷冷後胎仔脳から海馬を取り出し、定法により解離神経細胞を調整し、パンカー法を用いて初代解離神経細胞培養を行う。ドレブリンのノックダウンや過剰発現を行うためには、ドレブリン ShRNAベクターあるいは、ドレブリンE発現ベクターを解離細胞にエレクトロポレーション法により、導入後パンカー法による培養を行った。培養開始後48時間後にグルタルアルデヒドとパラフォルムアルデヒドを含む固定液により固定し、その後、ニューラビン II、ミオシン II、ドレブリンE、ゲルゾリン、Arp3、プロフィリン、 α アクチニン、 β アクチニン、ファッシン、ピンキュリン、SH3P7抗体を一次抗体とし、FITC標識あるいはローダミン標識あるいはCy5標識二次抗体を用いて免疫蛍光染色を行った。免疫染色像はcool Snap CCDカメラを装備したツァイス蛍光顕微鏡で、63倍の対物レンズを用い、メタモルフォイメージングシステムを用いて撮影、解析した。

(倫理面への配慮)

動物実験は群馬大学動物実験規定に則り、必要最小数の動物を用い、痛みも麻酔により最小限にとどめて行った。実験計画は群馬大学昭和町キャンパス動物実験委員会により承認を得ている。

C. 研究成果

ドレブリンEおよびAの共通部分を認識するM2F6の染色により、SVZとRMS中の細胞は強陽性であった。これに対して、ドレブリンAのみを認識する特異抗体DAS2の染色はこの細胞が陰性であった。そこで、ドレブリンEが成体ラット脳のSVZ-RMSで強く発現していることが分かった。SVZ-RMSにおけるドレブリン免疫陽性細胞の特徴としては、一部Ki-67陽性であり、すべての細胞はPSA-NCAM陽性であったが、GFAP染色は陰性であった。

M2F6とDAS2の二重染色の画像からドレブリンE+A細胞の可視化された画像が得られた。ドレブリンE+A細胞は移動神経前駆細胞の形態的な特徴を有していた。右側の嗅球が摘出された後、未摘出側と比べ、摘出側ではRMSでのドレブリンE+A細胞が有意に増加した。これは標的部位の欠損によって行き場を失った移動中の神経細胞がRMSに停留したことによるものと考えられる。

嗅球のドレブリン二重染色で、ドレブリン

E+A細胞は顆粒細胞層で放射状の移動が観察された。また、より外層ではドレブリンE+A細胞が減少していることがわかった。

ドレブリンの二種類の抗体とDoublecortinの抗体の三重染色の結果により、SVZ-RMSでドレブリンE+AシグナルはDoublecortinと共発現していた。しかし、嗅球の顆粒層においては、Doublecortinは移動後の樹状突起伸張時期にもしばらく存在するのに対して、ドレブリンE+Aシグナルは双極性の移動細胞以外の細胞体には発現していなかった。ドレブリンEが移動直後に消えたことから、細胞体におけるドレブリンEの発現は神経前駆細胞の移動時期に限定されることが分かった。

SVZ以外の成体脳神経新生領域と知られている海馬歯状回でも、ドレブリンE+A細胞が観察された。これらの細胞の多くはKi-67陽性であったが、GFAP陰性であった。形態的な移動細胞の特徴とDoublecortin陽性から、これらの細胞は移動中の神経前駆細胞であると同定された。なお、多数の分枝を持っているDoublecortin陽性細胞はドレブリンE+Aが細胞体に発現されなかった。以上の結果は、嗅球で観察された結果と一致していた。

他の脳部位で移動中の神経前駆細胞を検出するために、ドレブリンの二重染色で検索した結果、梨状葉II層においてドレブリンE+A細胞が見つかった。

ニューラビンII、ミオシンII、ドレブリンE、ゲルゾリン、Arp3、プロフィリン、 α アクチニン、 β アクチニン、ファッシン、ピンキュリン、SH3P7など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、ゲルゾリン、ニューラビンII、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。次に、タイムラプスイメージングでドレブリンの動きを解析し、トレッドミルにより逆向性に輸送されたアクチン線維はアクチン弓に到達するとドレブリンが結合すると同時に短く切断され、ミオシンII ATPase依存性に中心部まで運ばれ、そこで消失することを見いだした。さらに、ドレブリンの活性はミオシンIIと同じシグナル経路上にあることが判った。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が判り、またノックダウンや過剰発現の実験を用いて成長円錐の伸展のためにドレブリンが必要なことがわかった。

D. 考察

1 成体脳のドレブリン E+A-細胞は神経前駆細胞の特徴を有することから移動中の神経前駆細胞であることがわかった。これらの細胞は嗅球摘出により摘出側にたまり、絶えずに嗅球へ移動している。

2 アクチン細胞骨格結合蛋白としてのドレブリン E は成体脳における神経細胞移動の停止に関与することが示唆された。

3 梨状回に移動中の神経前駆細胞が存在することを発見した。

4 神経軸索先端の成長円錐内に存在するアクチン弓はドレブリンが切断され短くなったアクチン繊維に結合することにより、ミオシン II 依存性にアクチン繊維の逆向性移動が行われることにより形成されることが示唆された。

5 神経軸索先端の成長円錐内に存在するアクチン弓は成長円錐中央部に侵入した微小管が先端部へ進入するのを防ぐ役割があることが示唆された。

6 神経成長円錐の運動制御として、アクチンに基盤を置く考え方と微小管に基盤を置く考え方が提唱されているが、本研究により、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された。

E. 結論

成体脳の神経細胞移動に関しては、移動中神経前駆細胞の細胞体にはドレブリン A ではなくドレブリン E が発現していることが証明された。ドレブリン E はニューロン移動に密接に関連していることが示された。それに対して、Doublecortin は移動細胞に限らず、より成熟が進んだニューロンにも発現していることがわかった。さらに、成体脳の梨状葉に移動神経前駆細胞が存在することが明らかになり、生体脳における神経細胞新生の高次機能に対する関与は海馬や嗅球だけにとどまらず、脳内に広く一般的な現象である可能性が示唆された。

選択的神経回路形成の基盤となる神経軸索成長円錐の成長制御機構に関しては、アクチンと微小管のドレブリンを介した結合が重要な役割を果たしていることが判り、うつ病の脳器質性発症脆弱性の病態として、アクチンおよび微小管結合蛋白の解析の重要性が示唆された。

F. 健康危険情報

特に無し

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Sekino, Y., Tanaka, S., Hanamura, K., Yamazaki, H., Sasagawa, Y., Xue Y., Hayashi, K., and Shirao, T. "Activation of N-methyl-D-aspartate receptor induces a shift of drebrin distribution: disappearance from dendritic spines and appearance in dendritic shafts" *Mol. Cell. Neurosci.* 31: 493-504 (2006)
2. Takahashi, H., Mizui T. and Shirao, T. "Downregulation of drebrin A expression suppresses synaptic targeting of NMDA receptors in developing hippocampal neurons" *J. Neurochem* 97(s1):110-115 (2006)
3. Fujisawa, S., Shirao, T., Aoki, C. "In vivo, competitive blockade of NMDA receptors induces rapid shape change of post-synaptic spines and F-actin reorganization within dendritic spines of adult rat cortex." *Neuroscience* 140:1177-1187 (2006)
4. Chang EH, Savage MJ, Flood DG, Thomas JM, Levy RB, Mahadomrongkul, V., Shirao, T., Aoki, C., Huerta, P.T. "AMPA receptor downscaling at the onset of Alzheimer's pathology in double knock-in mice" *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 103: 3410-3415 (2006)
5. Shirai, K., Mizui, T., Suzuki, Y., Kobayashi, Y., Nakano, T., Shirao, T. "Differential effects of x-irradiation on immature and mature hippocampal neurons in vitro." *Neurosci. Lett.* 399: 57-60 (2006)
6. Majoul, I., Shirao, T., Sekino, Y., Duden, R. "Many faces of Drebrin: from building dendritic spines and stabilizing gap junctions to shaping

- neurite-like cell processes" *Histochem. Cell Biol.* 127:355-361 (2007)
7. Kojima, N., Shirao, T. "Synaptic dysfunction and disruption of the postsynaptic drebrin-actin complex: the study of neurological disorders accompanied by cognitive deficits." *Neurosci. Res.* 58:1-5 (2007)
 8. Kato, K., Sekino, Y., Takahashi, H., Yasuda, H., Shirao, T., "Increase of AMPA receptors-mediated miniature EPSC amplitude after chronic NMDA receptor blockade in cultured hippocampal neurons" *Neurosci. Lett.* 418:4-8 (2007)
 9. Kobayashi, C., Aoki, C., Kojima, N., Yamazaki, H., and Shirao, T., "Drebrin A content correlates with spine head size in the adult mouse cerebral cortex" *J. Comp. Neurol.* 503:618-626 (2007)
 10. Sekino Y, Kojima N, Shirao T. "Role of actin cytoskeleton in dendritic spine morphogenesis" *Neurochem. Int.* 51: 92-104 (2007)
 11. Sekino Y, Shirao T. "Role for signal propagation through the hippocampal CA2 field in memory formation" in *Lecture Notes in Artificial Intelligence*. Springer in press (2007/4/9) (book)
 12. Aoki C, Mahadomrongkul V, Fujisawa S, Habersat R, Shirao T. "Chemical and morphological alterations of spines within the hippocampus and entorhinal cortex precedes the onset of Alzheimer's disease pathology in double knock-in mice" *J. Comp. Neurol.* 505:352-362 (2007)
 13. Song M, Kojima N, Hanamura K, Sekino Y, Inoue KH, Mikuni M, Shirao T. "Expression of drebrin E in migrating neuroblasts in adult rat brain: coincidence between drebrin E disappearance from cell body and cessation of migration" *Neuroscience.* 152:670-682 (2008)
 14. Ivanov A, Esclapez M, Pellegrino C, Tomoaki Shirao T., and Ferhat L. "Drebrin A regulates the dendritic spine plasticity and synaptic function in cultured hippocampal neurons" *J. Cell Sci.* 122: 524-534 (2009)
 15. Takahashi, T, Yamazaki, H, Hanamura K, Sekino Y and Shirao T "AMPA receptor inhibition causes abnormal dendritic spines by destabilizing drebrin" *J Cell Sci.* in press.
 16. Mizui T., Kojima N, Yamazaki H, Katayama M, Hanamura K, Shirao T. "Drebrin E is involved in the mechanism regulating axonal growth through actin-myosin interactions." *J Neurochem* in press.
 17. 関野 祐子, 白尾 智明「興奮性シナプスのアクチン結合タンパクーその動態と機能ー」蛋白質・核酸・酵素 51: 350-356 (2006)
 18. 児島伸彦, 白尾智明「神経疾患とドレブリン」Clinical Neuroscience 24: 1392-1393 (2006)
 19. 高橋 秀人, 白尾 智明「スパイン形成とシナプス後部アクチンの特殊化ードレブリンの関与」生体の科学 58: 103-107 (2007)
 20. 高橋秀人, 白尾智明「スパイン形成過程におけるタンパク質間相互作用」生体の科学 58(5):472-473, 2007
 21. 田中聡一, 白尾智明「シグナルトランスダクションーレセプターと細胞内情報伝達カスケード」石渡, 桂, 桐野, 美宅 編「生物物理学ハンドブック」朝倉書店 (2007. 4. 25著書) 240-243
 22. 花村健次, 白尾智明「神経細胞樹状突起スパインのアクチン細胞骨格」日本薬理学雑誌 130, 352-357 (2007)

23. 児島伸彦, 関野祐子, 白尾智明: 樹状突起スパインの形成と機能制御にかかわるアクチン細胞骨格蛋白質 蛋白質核酸酵素 53: 424-429 (2008)
2. 学会発表
1. 20th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, 18-23 June, 2006, Kyoto, Japan. Yamazaki H., Iwasaki T., Hirose E., Shirao T. "Spikar, a novel drebrin binding protein, is involved in the formation of dendritic spines"
 2. Gordon Research Conferences "Cell Biology of the Neuron" chaired by Garner CC. and Goda Y. June 18-23, 2006 New London, NH, Shirao, T. Yamazaki H. "Spikar, a novel drebrin binding protein, is involved in the formation of dendritic spines."
 3. 7th Biennial Meeting, of the Asian Pacific Society for Neurochemistry, 2-5 July, 2006, Singapore. Shirao T., Yamazaki T. Role of Spikar, a novel drebrin-binding protein, in dendritic spine formation.
 4. 7th Biennial Meeting, of the Asian Pacific Society for Neurochemistry 2006. Sekino Y., Mizui T., Shirao T. "Blebbistatin inhibited NMDA receptor-dependent translocation of actin cytoskeleton of dendritic spines", Singapore, 2-5 July, ..
 5. Society for Neuroscience 36th Annual Meeting, 2006. Mizui T., Sekino Y., Shirao T., "Molecular machinery of activity-dependent drebrin translocation from dendritic spines to dendritic shafts." Atlanta, Georgia, Oct. 14-18
 6. Society for Neuroscience 36th Annual Meeting, 2006. Yamazaki H, Kato K, Tokuyama T, Sekino Y, Shirao T. "Spikar, a novel drebrin binding protein, is involved in the formation of dendritic spines." Atlanta, Georgia, Oct. 14-18
 7. Society for Neuroscience 36th Annual Meeting, 2006. Shirao T., Takahashi H., Yamazaki H. "AMPA receptor regulates drebrin clustering by changing its dynamics in dendritic spines. Atlanta, Georgia, Oct. 14-18
 8. Society for Neuroscience 36th Annual Meeting, 2006. Mahadomrongul V., Lazaro-Munoz G., Cain C. K., Shirao T., Aoki, C. J. "The impact of fear conditioning on the composition of spine proteins in the lateral amygdala: drebrin and glutamate receptors" Atlanta, Georgia, Oct. 14-18
 9. First WICI International Workshop on "Web Intelligence (WI) meets Brain Informatics (BI)". Shirao T., "Proteomics odyssey of synaptogenesis in the CNS: a discovery of drebrin and Spikar" Dec 15-16, 2006, Beijing, China
 10. 7th IBRO World Congress of Neuroscience, Melbourne AUSTRALIA JULY 12-17 2007, Shirao T. "Bidirectional regulation of NMDA receptor and actin cytoskeleton in dendritic spine" in the symposium of "MECHANISMS OF STRUCTURAL PLASTICITY AT EXCITATORY SYNAPSES"
 11. 21th ISN Biennial Meeting, August 23, 2007, Cancun, Mexico. Shirao T., Takahashi, H., Mizui, T., Sekino, Y. "Genetic and activity-dependent control of spinous actin cytoskeleton in spine formation." in the Symposium on "Cytoskeletal dynamics and signal transduction in neurons" (invited).
 12. Society for Neuroscience 37th Annual Meeting, 2007. Kato K, Sekino Y, Takahashi H, Yasuda H, and Shirao T

- "Chronic NMDA receptor blockade induces homeostatic synaptic scaling of AMPA receptors in cultured hippocampal neurons" San Diego, CA, Nov. 3-7
13. Society for Neuroscience 37th Annual Meeting, 2007. Takahashi H, Yamazaki H, and Shirao T "AMPA-type glutamate receptors regulate drebrin turnover during development" San Diego, CA, Nov. 3-7
 14. Society for Neuroscience 37th Annual Meeting, 2007. Mizui T, Katayama M, and Shirao T "Roles of drebrin in the neurite outgrowth" San Diego, CA, Nov. 3-7
 15. Society for Neuroscience 37th Annual Meeting, 2007 Aok C, Fujisawa S, Mahadomrongkul V, Habersat R, Sabaliauskis N, Hernandez H, Levy R, Kojima N and Shirao T. "Alzheimer's model animals show reduction of drebrin A within spines and this may lead to impairment of synaptic activity-dependent trafficking of NMDAR subunits into spines." San Diego, CA, Nov. 3-7
 16. Society for Neuroscience 37th Annual Meeting, 2007 Okamoto T, Shirao T, Nagao S "Time for consolidation of motor memory during motor learning estimated long-term adaptation of horizontal optokinetic response eye movement in mice" San Diego, CA, Nov. 3-7
 17. 8th Biennial Meeting of the Asia-Pacific Society for Neurochemistry (APSN 2008) Tomoaki Shirao "Ionotropic glutamate receptors modify dendritic spine morphology by regulating drebrin dynamics". Shanghai, PR China (Invited) June 24-26th
 18. Society for Neuroscience 37th Annual Meeting, 2008 Kenji Hanamura, Nobuhiko Kojima, Hiroyuki Yamazaki, Tomoaki Shirao "Isoform conversion of drebrin during neuronal development regulates synapse formation and fear memory." Washington, DC, Nov. 15-19
 19. Society for Neuroscience 37th Annual Meeting, 2008 Hiroyuki Yamazaki, Kenichi Kato, Yuko Sekino, Tomoaki Shirao "Regulation of dendritic spine formation by Spikar-Drebrin interaction" Washington, DC, Nov. 15-19
 20. 水井利幸、関野祐子、白尾智明 "Time-lapse analysis of the translocation of drebrin-actin complex from dendritic spines to dendritic shafts by glutamate stimulation." 第29回日本神経科学大会、京都、2006年7月19日～21日
 21. 白井克幸、水井利幸、鈴木義行、小林靖彦、中野隆史、白尾智明 "Differential effects of x-irradiation on immature and mature hippocampal neurons *in vitro*." 第29回日本神経科学大会、京都、2006年7月19日～21日
 22. 山崎博幸、白尾智明 "Spinous and karyoplasmic protein, Spikar, is involved in the formation of dendritic spines" 第29回日本神経科学大会、京都、2006年7月19日～21日
 23. 高橋秀人、白尾智明 "Distinct contributions of AMPA and NMDA receptors for drebrin turnover in dendritic spines" 第29回日本神経科学大会、京都、2006年7月19日～21日
 24. 水井利幸、片山理人、花村健次、白尾智明 "Differential distribution of actin-binding proteins in the growth cone of hippocampal neurons." 第49回日本神経化学大会、名古屋、2006年9月14日～16日
 25. 徳山朋子、山崎博幸、白尾智明 「ドレブリン結合タンパク質 Spikar における核外移行配列の解析」 第53回北関東医学会総会、

前橋、2006年9月21日～22日

26. 加藤健一、山崎博幸、² 関野祐子、白尾智明 「ドレブリン結合蛋白 Spikar の樹状突起スパイン形成における役割」第115回日本薬理学会関東部会、高崎、2006年9月28日～29日
27. 白尾智明 「神経細胞樹状突起スパインのアクチン細胞骨格」第80回日本薬理学会年会、名古屋、2007年3月14日～16日 (シンポジウム「神経系アクチン細胞骨格の基礎と臨床」)(シンポジウム)
28. 高橋秀人、山崎博幸、白尾智明 「発生過程における樹状突起スパイン形態形成のAMPA型およびNMDA型グルタミン酸受容体による逐次的制御」第80回日本薬理学会年会 (年会優秀発表賞ミニシンポジウム)、名古屋、2007年3月14日～16日
29. 加藤健一、白尾智明、高橋秀人、関野祐子 「Increase of AMPA-mediated mEPSC amplitude induced by chronic treatment with AP5 in cultured hippocampal neurons」第80回日本薬理学会年会、名古屋、2007年3月14日～16日
30. 山崎博幸、加藤健一、関野祐子、児島伸彦、白尾智明 「Spikar plays a role in dendritic spine formation but not in synapse formation.」第84回日本生理学会大会、大阪、2007年3月20日～22日
31. 花村健次、宋明橋、児島伸彦、関野祐子、白尾智明 「成体脳の新生神経細胞の移動停止時にドレブリンEは細胞体から消失する。」第22回神経組織の成長・再生・移植研究会 学術集会、岡山、2007年5月26日
32. 水井利幸、片山理人、白尾智明 「Enhancement of axon and dendrite outgrowth by drebrin expression at early developmental stages in hippocampal neurons」第30回日本神
- 経科学大会、横浜、2007年9月10日～12日
33. 小林千穂、Chiye Aoki、白尾智明 「Relation between dendritic spine size and its drebrin A level in adult mouse brain」第30回日本神経科学大会、横浜、2007年9月10日～12日
34. 花村健次、宋明橋、児島伸彦、関野祐子、白尾智明 「Cessation of neuronal migration in adult rodent olfactory bulb is paralleled with the disappearance of drebrin E from the cell body」第30回日本神経科学大会、横浜、2007年9月10日～12日
35. 山崎博幸、加藤健一、笹川快夫、関野祐子、白尾智明 「Spikar-dependent spine formation does not necessary need the translocation of Spikar into nucleus..」第30回日本神経科学大会、横浜、2007年9月10日～12日
36. 加藤健一、白尾智明、高橋秀人、関野祐子 「Effects of chronic blockade of NMDA receptors during synaptogenesis on glutamate receptor-mediated currents in cultured hippocampal neurons」第30回日本神経科学大会、横浜、2007年9月10日～12日
37. 白尾智明 「Glutamate receptor activity regulates drebrin-dependent accumulation of spine resident proteins」第30回日本神経科学大会、横浜、2007年9月10日～12日(シンポジウム「神経活動とスパイン形態：アクチンダイナミズムとその制御因子」)(シンポジウム)
38. 山崎博幸、加藤健一、関野祐子、白尾智明 「Spikar, a novel transcriptional-coactivator, regulates dendritic spine formation」第81回日本薬理学会年会、横浜、2008年3月17日～19日
39. 児島伸彦、竹田麗子、白尾智明