

博士（医学） 森 秀樹

学位論文題名

血小板 α -2アドレナリン性受容体を介する情報伝達機構を指標とした
内因性うつ病の臨床生化学的研究

学位論文内容の要旨

I はじめに

未だ本態不明なうつ病の病因の神経化学的基盤の一つとして、中枢神経シナプスに存在し、ノルアドレナリンの放出を調節する前シナプス性受容体としての作用をもつ α -2アドレナリン性(α -2)受容体の機能に変化があることが想定されてきている。この仮説は、うつ病患者の中権神経において直接研究することが困難なために、末梢血液中の血小板に存在する α -2受容体を有用なモデルとして盛んに検索されてきた。これまでに、受容体結合測定法により、うつ病患者で血小板 α -2受容体数の変化についていくつかの報告があるが一定の結論を得るに至っていない。この不一致の理由として、患者が服用している治療薬の影響や対象群の個体差によるものほかに、標識に用いられた各種のリガンドが、血小板 α -2受容体の異なる親和性の状態や構造を標識していることが指摘されてきた。したがって、うつ病患者において血小板 α -2受容体に機能の変化があるか否かを解明するためには、未服薬で診断学的に均一なうつ病患者群に限定したうえで、 α -2受容体に連関する細胞内の情報伝達系の機能を評価することが必要と考えられる。

ところで、これまでに血小板 α -2受容体に連関する情報伝達機構は、Giとよばれる抑制性GTP結合蛋白質を介したアデニル酸シクラーゼ(AC)活性の抑制が唯一のものと考えられてきたが、この考えは次第に不確実なものとなっている。われわれはこれまでに血小板をエピネフリンで刺激したときイノシトール1リン酸(IP-1)の蓄積反応として示されるイノシトールリン脂質(PI)代謝回転の亢進が生じ、さらに薬理学的検討を行った結果、これが α -2受容体を介する細胞内情報伝達機構が関与している可能性を示す若干の所見を得た。本研究は、このIP-1蓄積反応を指標として内因性うつ病における血小板 α -2受容体機能の評価を試みたものである。

II 対象と方法

研究趣旨を十分に説明し、採血に同意の得られた内因性うつ病の診断基準をみたす未治療の患者15名〔男性7名、女性8名、平均年齢 43.5 ± 3.8 (S.E.M)〕と性および年齢をできるだけ一致させた健康成人15名〔男性7名、女性8名、平均年齢 40.9 ± 3.1 〕を対象として採血した。うつ病の重症度は17項目ハミルトンうつ病評価尺度(HDRS)により評点した。採血は日内リズムが結果に影響を与えないように、すべて午前10時から正午の間に行われた。遠心法により血小板を採取し、すみやかにHEPES緩衝液に浮遊させて [^3H] - myo-inositol を $50 \mu\text{Ci}/\text{ml}$ の濃度で添加し 37°C 2時間インキュベーションすることにより取りこませた。洗滌した後、 $10 \mu\text{M}$ リチウム存在下で血小板内IP-1ホスファターゼを阻害した血小板浮遊液($10^9/\text{ml}$)を $10 \mu\text{M}$ および $100 \mu\text{M}$ エピネフリンとともに15分間インキュベーションした。生成した [^3H] IP-1をBerridgeらの報告した方法に従いイオン交換樹脂カラムで分離定量した。

III 結 果

- (1) エピネフリン刺激性IP-1蓄積反応の基礎的検討 エピネフリン刺激による血小板内IP-1蓄積反応はエピネフリンの濃度依存性であり、エピネフリンの50%反応濃度EC50値は $5 \mu\text{M}$ であった。さらに $10 \mu\text{M}$ エピネフリン刺激によって生じるIP-1蓄積反応に対して、選択的 $\alpha-2$ アドレナリン性受容体阻害剤であるヨヒンビンは濃度依存性に抑制し阻害定数(Ki)は 60.3nM であった。
- (2) エピネフリン刺激性IP-1蓄積反応の同一個人内の変動 正常対照群の同一個人3名から1-3週の間隔で一日のうち一定時間に採血して得た血小板についてIP-1蓄積反応の変動を検討した。変動係数は、 $10 \mu\text{M}$ および $100 \mu\text{M}$ エピネフリン刺激とともに10%以下であることから、同一個人内のIP-1蓄積反応は変動が少なく安定していた。
- (3) 内因性うつ病患者群と健常者群の比較 未治療で未服薬の内因性うつ病患者群は、性および年齢を合致させた健常者群と比べて、 $10 \mu\text{M}$ および $100 \mu\text{M}$ エピネフリン刺激性IP-1蓄積反応を指標にしたとき、ともに統計学的に有意な高値を示した。またIP-1の基礎値およびassay vial中の血小板数には両群間には有意差はなかった。

- (4) うつ病の重症度とエピネフリン刺激性IP-1蓄積反応の関係 15名のうつ病患者の症状の重症度は、17項目ハミルトンうつ病評価尺度(HDRS)で12点から36点の間に分布していた。各個人のHDRSの総得点と $10 \mu\text{M}$ または $100 \mu\text{M}$ エピネフリン刺激性IP-1蓄積反応の間に、スピアマンの順位相関検定で有意な相関はみられなかった。

V 考 察

従来放射性リガンドを用いた受容体結合実験により、ヒト血小板には α -2アドレナリン性(α -2)受容体が存在し、この受容体を介してcAMPの低下が起こることから、 α -2受容体が連関する唯一の細胞内情報伝達機構は、アデニル酸シクラーゼ抑制系であることが知られていた。しかし本研究で示したエピネフリン刺激によるEC50値5 μ MのIP-1蓄積反応は、この反応にたいする α -2受容体の選択的阻害剤であるヨヒンビンの阻害定数が2桁のnMオーダーであり、他のモノアミン受容体阻害剤が1 μ Mで全く抑制しないことから α -2受容体を介して生じるものと考えられる。すなわち α -2受容体がエピネフリン刺激を伝達してPI代謝回転の亢進を起こしていることが薬理学的に明らかとなった。

内因性うつ病において血小板 α -2アドレナリン性受容体を介したPI反応について検討した報告はこれまでになく、我々の報告が最初のものになると思われる。エピネフリン10 μ Mおよび100 μ Mで刺激したときの血小板内IP-1蓄積反応は、同一個人内では変動が少なく安定した指標であり、対照群に比べてうつ病患者群でとにも高値を示したことから、うつ病では血小板 α -2受容体の反応性が亢進していることが示され、機能の亢進が推定される。しかしこの所見が、受容体結合実験でうつ病患者の血小板 α -2受容体数の増加を見出したこれまでの報告を細胞内情報伝達系レベルで支持するものかどうかはさらに詳細な検討を要する。また近年ヒトの脳内の α -2受容体にはサブタイプがあることが指摘されていて、血小板の α -2受容体が中枢神経のどのような機能をもつ α -2受容体に対応するものかは、今後の解明を待たなければならないし、中枢神経と血小板という異なる部位の α -2受容体で同一の変化を起こしてくる共通のシグナルも不明である。しかし血小板を用いることによって、ある個人の α -2受容体の状態を容易に測定することができ、内因性うつ病における α -2受容体と連関する細胞内情報伝達系レベルでの評価が可能となるのである。

血小板 α -2アドレナリン性受容体をモデルとしたうつ病の臨床生化学的研究は、1980年代初めからさかんに行われてきたが、 α -2受容体を介したIP-1蓄積反応が亢進しているという本研究で示した新所見が、未だ本態不明なうつ病の生物学的研究を進めるうえで今後重要な検討指標となることが期待される。

学位論文審査の要旨

主査 教授 山下 格

副査 教授 牧田 章

副査 教授 菅野 盛夫

中枢神経シナプスに存在する α -2アドレナリン性受容体(α -2受容体)の機能に変化のあることが、未だ本態不明なうつ病患者の神経化学基盤の一つとして想定されてきている。この仮説は、末梢血液中の血小板に存在する α -2受容体を有用なモデルとして臨床的に盛んに検索されてきた。われわれはこれまでに血小板をエピネフリンで刺激したときイノシトール1リン酸(IP-1)の蓄積反応として示されるイノシトールリン脂質(PI)代謝回転の亢進が生じることを見出し、さらに薬理学的検討を行い、これが α -2受容体を介する細胞内情報伝達機構が関与している可能性を示す若干の所見を得た。本研究は、このIP-1蓄積反応を指標として内因性うつ病における血小板 α -2受容体機能の評価を試みたものである。

対象と方法：研究趣旨を十分に説明し、採血に同意の得られた内因性うつ病の診断基準をみたす未治療の患者15名〔男性7名、女性8名、平均年齢43.5歳〕と性および年齢をマッチさせた健康成人15名〔男性7名、女性8名、平均年齢40.9歳〕を対象として採血した。うつ病の重症度は17項目ハミルトンうつ病評価尺度(HDRS)により評点し、採血は、すべて午前10時から正午の間に行った。遠心法により血小板を採取し、すみやかにHEPES緩衝液に浮遊させて [3 H]-myo-inositolを添加し37°C 2時間のインキュベーションにより血小板イノシトールリン脂質を標識した。洗滌した後に、リチウム存在下で血小板内IP-1ホスファターゼを阻害した血小板浮遊液($10^9/\text{ml}$)を各濃度のエピネフリンとともに15分間インキュベーションした。生成した [3 H]IP-1をイオン交換樹脂カラムで分離定量した。またアッセイはすべてduplicateで行い、エピネフリン刺激性IP-1蓄積反応は、エピネフリン非存在下に対する存在下でのIP-1蓄積量の割合で表示した。

結果と考察：(1) 基礎的検討 エピネフリン刺激による血小板内IP-1蓄積反応は1-100 μ Mの範囲でエピネフリンの濃度依存性であり、エピネフリンの50%反応濃度EC50値は5 μ Mであった。さらに10 μ Mエピネフリン刺激によって生じるIP-1蓄積反応に対して、選択性 α -2アドレナリン性受容体阻害剤であるヨヒンビンは濃度依存性に抑制し、阻害定数(Ki)は60.3nMであった。すなわちエピネフリン刺激によりIP-1蓄積反応で示されるPI代謝回転の亢進

は、 α -2受容体を介して生じることが薬理学的に明らかとなった。

(2) 研究対象となった15名のうつ病患者の症状の重症度は、17項目ハミルトンうつ病評価尺度(HDRS)で12点から36点の間に分布していた。各個人のHDRSの総得点と $10\mu M$ または $100\mu M$ エピネフリン刺激性IP-1蓄積反応の間には、スピアマンの順位相関検定で有意な相関はみられなかった。

(3) エピネフリン $10\mu M$ 刺激による健常者とうつ病患者の血小板IP-1蓄積反応：健常者群は、平均 $129\% \pm 4.2SEM$ 、うつ病患者は、平均 $151.5\% \pm 5.5SEM$ で、うつ病群は、健常者群に対してt検定により0.5%の危険率で有意な高値をしめした。 $100\mu M$ エピネフリン刺激による血小板IP-1蓄積反応の健常者群とうつ病患者群の比較：健常者群が平均 $138.1\% \pm 5.2SEM$ であるのに対して、うつ病群では平均 $151.5\% \pm 5.1SEM$ で、t検定により1%の危険率で有意な高値を示した。すなわち未治療で未服薬の内因性うつ病患者群は、年齢と性をマッチさせた健常者群に比べて、 $10\mu M$ および $100\mu M$ エピネフリン刺激により血小板IP-1蓄積反応を指標にしたとき、とにも統計学的に有意な高値を示した。

以上の結果から、内因性うつ病において、IP-1蓄積反応を指標とした血小板 α -2受容体の反応性は亢進していることが示され、うつ病患者の血小板 α -2受容体機能の亢進が推定される。すなわち血小板を用いることによって、内因性うつ病における α -2受容体と連関する細胞内情報伝達系レベルでの評価が可能となり、本研究で示した新所見が、未だ本態不明なうつ病の生物学的研究を進めるうえで今後重要な検討指標となることが期待される。

質疑応答：問；ミオイノシトールを取込ませた後の何をみているのか？

答；エピネフリン刺激によるイノシトールリン脂質代謝回転の亢進率を示すIP-1の蓄積をみている。

問；血小板と中枢神経の α -2受容体に相関はあるのか？

答；動物実験でいくつかの報告はあるが今のところ明確な結論はでていない。本研究では、血小板 α -2受容体をうつ病患者で測定可能な有用な指標として用いた。

問；治療後の変化について測定したか？

答；測定していない。intact cellを用いた本研究では、治療後の薬物要因を除くことが難しく、多くの予備的な検討を要する。しかし今後の重要な検討課題と思われる。