

学 位 論 文 題 名

血小板 $\alpha-2$ 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 $\alpha-2$ アドレナリン性（ $\alpha-2$ ）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
枢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 $\alpha-2$ 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 $\alpha-2$ 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
のほかに、標識に用いられた各種のリガンドが、血小板 $\alpha-2$ 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 $\alpha-2$ 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、 $\alpha-2$ 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 $\alpha-2$ 受容体に連関する情報伝達機構は、 G_i 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 $\alpha-2$ 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 $\alpha-2$ 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集し、すみやかに HEPES 緩衝液に浮遊させて $[^3\text{H}]$ -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、 10mM 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 $[^3\text{H}]$ 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濃度依存性に抑制し阻害定数 (K_i) は 0.3nM 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での変動 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、同一個人内での 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。

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 $\alpha-2$ アドレナリン性($\alpha-2$)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、 $\alpha-2$ 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 $\alpha-2$ 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 $\alpha-2$ 受容体を介して生じるものと考えられる。すなわち $\alpha-2$ 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 $\alpha-2$ 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 $\alpha-2$ 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 $\alpha-2$ 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 $\alpha-2$ 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 $\alpha-2$ 受容体が中枢神経のどのような機能をもつ $\alpha-2$ 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 $\alpha-2$ 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 $\alpha-2$ 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 $\alpha-2$ 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 $\alpha-2$ 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、 $\alpha-2$ 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 $\alpha-2$ アドレナリン性受容体($\alpha-2$ 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 $\alpha-2$ 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、さらに薬理的検討を行い、これが $\alpha-2$ 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 $\alpha-2$ 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集し、すみやかに HEPES 緩衝液に浮遊させて [³
H] -myo-inositol を添加し37℃ 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(10⁹/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 [³H] 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、選択的 $\alpha-2$
アドレナリン性受容体阻害剤であるヨヒンビン濃度依存性に抑制し、阻害定数(Ki)は60.3
nM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、 $\alpha-2$ 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 $10\mu\text{M}$ 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 $10\mu\text{M}$ 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 $129\% \pm 4.2\text{SEM}$ 、うつ病患者は、平均 $151.5\% \pm 5.5\text{SEM}$ 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。 $100\mu\text{M}$ 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 $138.1\% \pm 5.2\text{SEM}$ であるのに対して、うつ病群では平均 $151.5\% \pm 5.1\text{SEM}$ 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、 $10\mu\text{M}$ および $100\mu\text{M}$ 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、ともに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 $\alpha-2$ 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 $\alpha-2$ 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 $\alpha-2$ 受容体と関連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 $\alpha-2$ 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 $\alpha-2$ 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。