

学位論文題名

抗うつ薬、ノルアドレナリン、セロトニンが成体海馬  
歯状回由来神経前駆細胞に及ぼす影響についての研究

学位論文内容の要旨

【背景と目的】

現在、うつ病の治療は、セロトニン(5-HT) やノルアドレナリン(NA) といったモノアミンを増加させる薬剤(選択的 5-HT 再取り込み阻害薬、5-HT/NA 再取り込み阻害薬など)による薬物療法が中心となっている。これら抗うつ薬は投与してから数時間以内に脳内の 5-HT、NA を増加させることが動物実験で示されているが、臨床での治療効果発現までには数週間の慢性投与が必要である。従って、抗うつ薬による治療メカニズムとしてモノアミン増加だけでは説明が難しく、他のメカニズムが注目されてきている。近年、成体の脳においても海馬歯状回(DG)では、神経幹・前駆細胞が存在し、それらが増殖、分化することにより神経細胞が新生されることが明らかにされている。臨床における抗うつ薬によるうつ病の症状改善の時間経過と類似して抗うつ薬を動物に慢性投与すると DG の神経幹・前駆細胞の増殖は促進される。逆にうつ病発症の危険因子と考えられるストレスを負荷することによって DG の神経幹・前駆細胞の増殖は抑制される。さらには海馬神経新生を阻害した動物を用いると抗うつ薬による抗うつ様作用が消失することなどが報告されていることから、抗うつ薬の治療メカニズムの新しい仮説として海馬神経新生促進仮説が提唱され、注目を集めている。抗うつ薬が海馬神経新生を増やすメカニズムについては、神経栄養因子発現誘導などを介した間接的な作用の可能性が示唆されているが、ほとんど明らかになっていない。本研究では、抗うつ薬の海馬神経新生増加のメカニズムを明らかにするために、抗うつ薬、NA、5-HT が成体ラット DG 由来神経前駆細胞の増殖、分化、アポトーシスに及ぼす影響について検討した。

【方法と結果】

まず成体ラット海馬歯状回由来の神経前駆細胞 (Adult rat Dentate gyrus-derived neural Precursor cell, ADP) の培養系を確立した。8 週齢の雄性 SD ラットの DG を切り出し、酵素処理して細胞を単離した。その後、Percoll 溶液を用いた密度勾配遠心法により目的各分を分取し、単層培養法にて培養した。培地は B27 supplement, bFGF を含む neurobasal 培地を用い無血清下で、poly L-ornithine-laminin coating dish で培養した。増殖してきた細胞における特異的マーカーの発現を免疫蛍光抗体法で検討したところ、神経幹・前駆細胞のマーカーである Nestin、GFAP、SOX2 陽性であり、immature neuron マーカーである DCX、Prox1 陰性であった。また、増殖細胞のマーカーである BrdU 陽性であることも確認されたが、細胞を長期間培養すると増殖能が低下することから増殖能は限定的なものであった。さらに、分化誘導因子であるレチノイン酸存在下で細胞を培養すると、ニューロンのマーカーである TuJ1 陽性細胞、アストロサイトのマーカーである GFAP 陽性細胞、またごく少数ではあるがオリゴデンドロサイトのマーカーである O4 陽性細胞が検出されたことから分化能も認められた。従って、神経幹・前駆細胞の特徴を有していることが確認された。そこ

で、*in vivo* で DG の神経新生を促進することが報告されている 4 種の抗うつ薬 (5-HT 再取り込み阻害薬フルオキセチン、三環系抗うつ薬イミプラミン、NA 再取り込み阻害薬レボキセチン、モノアミン酸化酵素阻害薬トラニルシプロミン) 及び NA、5-HT が ADP の増殖、ニューロン分化、アポトーシスに及ぼす影響について検討した。増殖作用は Alamar Blue assay 法を用いて評価した。ニューロン分化はレチノイン酸により分化誘導されるニューロン (Tuj1 陽性細胞) を、アポトーシスはスタウロスポリンにより誘導される TUNEL 陽性細胞を免疫染色にて検出、カウントし、陽性率の変化を指標に評価した。その結果、4 種の抗うつ薬、5-HT は ADP の増殖、ニューロン分化、アポトーシスのいずれに対しても影響を及ぼさなかった。一方、NA は ADP のニューロン分化、アポトーシスには影響を及ぼさなかったが、ADP 増殖を有意に促進した。NA の ADP 増殖促進作用メカニズムを検討するために、RT-PCR 法を用いて ADP におけるアドレナリン受容体 (AR) サブタイプの mRNA 発現を検討したところ、 $\alpha_{1A}$ 、 $\alpha_{1B}$ 、 $\alpha_{1D}$ 、 $\alpha_{2C}$ 、 $\beta_1$  及び  $\beta_2$ -AR の mRNA 発現が確認された。NA の ADP 増殖促進作用は、プラゾシン ( $\alpha_1$ -AR 非選択的アンタゴニスト)、ヨヒンビン ( $\alpha_2$ -AR 非選択的アンタゴニスト) によっては拮抗されず、プロプラノロール ( $\beta$ -AR 非選択的アンタゴニスト) により拮抗されたことから、 $\beta$ -AR が関与していると考えられた。さらに、NA の ADP 増殖促進作用は CGP 20712A ( $\beta_1$ -AR 選択的アンタゴニスト) によっては拮抗されず、ICI-118,551 ( $\beta_2$ -AR 選択的アンタゴニスト) によって拮抗された。またサルメテロール ( $\beta_2$ -AR 選択的アゴニスト) 刺激によっても ADP 増殖の促進が認められたことから、NA の ADP 増殖促進作用は  $\beta_2$ -AR を介していることが明らかとなった。

#### 【考察】

DG における神経幹・前駆細胞は、形態、特異的マーカーの発現、増殖能などの特徴から現在 4 つのステージに分類されているが、ADP はその特徴から type-2a cell に近い early progenitor cell に相当すると考えられた。*In vivo* 研究により、NA が DG の神経幹・前駆細胞の増殖に関与していることは報告されている。今回の結果により NA は  $\beta_2$ -AR を介して early progenitor cell の増殖を促進している可能性が初めて示された。従って、抗うつ薬の海馬神経新生促進作用のメカニズムとして、抗うつ薬が直接的に神経前駆細胞に作用するのではなく、脳内 NA 濃度を増加させ、神経前駆細胞上の  $\beta_2$ -AR 刺激を介した神経前駆細胞の増殖促進作用が一部関与している可能性が示唆された。一方、5-HT は NA と異なり ADP に対する作用が認められなかったことから、神経前駆細胞には直接作用せずに周辺の成熟神経細胞などに作用して神経栄養因子などの発現を誘導して神経新生を間接的に促進する作用が主流なメカニズムなのかもしれない。

これまでに、DG の神経幹・前駆細胞増殖制御における  $\beta_2$ -AR の関与についての検討は、*in vivo* ではなされていないことから、今後 *in vivo* での検討が必要であると思われる。また、ADP は  $\beta_2$ -AR 刺激により増殖促進されたが、その下流の作用メカニズムを明らかにすることにより、抗うつ薬による海馬神経新生促進のメカニズムがより明らかになると共に新規抗うつ薬のターゲット分子発見に繋がることも期待される。

#### 【結論】

抗うつ薬は、脳内 NA 濃度を増加させ、海馬歯状回の early progenitor cells 上の  $\beta_2$ -AR を刺激して early progenitor cells を増殖促進させることによって海馬神経新生を促進させている可能性が示唆された。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 藤 田 博 美  
副 査 教 授 森 本 裕 二  
副 査 教 授 渡 邊 雅 彦  
副 査 教 授 神 谷 温 之  
副 査 教 授 小 山 司

## 学位論文題名

### 抗うつ薬、ノルアドレナリン、セロトニンが成体海馬 歯状回由来神経前駆細胞に及ぼす影響についての研究

うつ病治療にはノルアドレナリン(NA)やセロトニン(5-HT)を増加させる薬剤が使用されており、これら抗うつ薬による治療メカニズムに成体海馬歯状回における神経細胞新生の関与が示唆されている。本論文では、抗うつ薬、5-HT、NAが成体海馬歯状回の神経前駆細胞に及ぼす直接作用を明らかにすることを目的に、成体ラット海馬歯状回由来神経前駆細胞(ADP)の培養系を確立し、early progenitor cellの特徴を有することを明らかにした。また、ADPの増殖、分化、アポトーシスに対する種々抗うつ薬、NA、5-HTが及ぼす影響について検討を行い、NAが $\beta 2$ レセプターを介してADPの増殖を促進することを見出した。

森本教授との質疑応答では、海馬の神経新生増加がどのようにしてうつ病改善に結びつくのか？に対し、海馬は情動を司る扁桃体などとネットワーク形成をしていることなどから新たな神経ネットワーク構築を介してうつ症状改善につながっている可能性があるという回答し、海馬神経新生を増やすことで認知症治療には期待できないのか？に対しては、新生された神経が記憶に関与することも報告されていることから認知症治療に対しても期待できるかもしれないと回答した。渡邊教授との質疑応答では、ADP増殖促進作用を示したNA濃度は生理的に妥当な濃度なのか？に対し、海馬スライスの電気生理実験では数十 $\mu\text{M}$ のNAが必要であることから、シナプス間隙中では今回用いた高濃度のNAが存在しうると考えていると回答した。cAMP-CREBリン酸化のシグナル伝達経路の活性化は神経前駆細胞でも認められるのか？に対しては、in vivo研究では、BrdU陽性細胞ではCREBリン酸化が認められていないことから神経前駆細胞ではこのシグナル伝達経路の活性化が起きていないのかもしれないと回答した。では、 $\beta 2$ レセプター刺激によってどのようなシグナル伝達経路が活性化されているのか？に対しては、MAPKの活性化もひとつの候補であると回答した。神谷教授との質疑応答では、1回のパーコール分離操作では目的外の細胞が増殖してくることは無いのか？に対しては、無血清条件下という厳しい培養条件なので他の細胞が増殖してくることは比較的少ないが、ホモジニアスなADPを得られる確率

は2-3回に1回である。そのため毎回、免疫染色にてその純度を確認してから実験に使用していると回答した。ADPと異なるタイプの神経幹・前駆細胞に対しては5-HTは作用を示すのか？に対しては、stem like cellに対して5-HTは増殖促進作用を示すといった報告があると回答した。小山教授との質疑応答では、一昔前の研究である抗うつ薬投与による $\beta$ レセプターの脱感作はどの $\beta$ サブタイプであるのか？に対して、大脳皮質の $\beta$ 1レセプターに対する報告が多いと回答し、 $\beta$ 2作動薬による抗うつ作用の臨床報告はないのか？に対しては、古くに報告があり、その作用オンセットが三環系抗うつ薬に比べ早いことが示されていると回答した。BrdUをイメージングすることによって患者脳で神経新生を検出できないのか？に対しては、BrdUの検出は死後脳でないと難しいが、fMRIなどで神経幹前駆細胞を検出できるという報告もあるので可能であると思うと回答した。藤田教授との質疑応答では、神経系でのストレス応答は何か細胞内の分子レベルでわかっているのか？に対しては、グルココルチコイドなどによって神経新生が抑制されるという程度のことしかわかっておらず、細胞内の分子レベルに関しては不明であると回答し、低酸素条件下で培養を検討したことがないのか？に対しては、低酸素条件下における神経前駆細胞の培養の報告がないことから試したことがないが興味深いので今後の検討課題としたいと回答した。In vivoでの神経新生に薬剤の慢性投与が必要なのに比べ、in vitroでのNA処置期間が3日間では整合性があわないのではないか？に対してはin vivoでは薬物動態面の影響があり、脳内で常にNAが増加しているわけではないと考えられるが、in vitroでは3日間常時高濃度のNAに晒されているために、短い処置時間で反応するのではないかと考えていると回答した。

この論文は、新たな神経前駆細胞の培養系を確立し、神経前駆細胞の増殖、分化、アポトーシスに対して抗うつ薬、NA、5-HTが及ぼす影響について検討することにより、非常に興味深い知見を見いだしたことで高く評価され、今後、抗うつ薬の作用機序の解明や新たな抗うつ薬の標的の発見などに対して更なる研究の発展が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。