学位論文題名

ドパミンが成体海馬の神経細胞新生に及ぼす影響に関する検討

学位論文内容の要旨

【背景と目的】

従来、胎生期や幼若期に起こるとされていた神経細胞新生が、成体においても脳室下帯 (subventricular zone, SVZ) や海馬歯状回の下顆粒細胞層 (subgranular zone, SGZ) に起こることが報告されている。近年の報告により、海馬歯状回で起こるこの神経細胞新生は、抗うつ薬の抗うつ効果や気分障害の病態に関与していることが示唆されている。しかしながら、抗うつ薬がどのように神経細胞新生を制御し、抗うつ効果を発現しているかについては、十分に解明されていない。

ドパミンは、セロトニンやノルアドレナリンとともに気分障害の治療において重要なターゲットとして考えられている。気分障害患者では、一部の所見からドパミン量が低下していることが報告されている。また、ドパミン D2-like 受容体アゴニストであるプラミペキソールやプロモクリプチンは、難治性うつ病に対して有効であることが報告されている。現在までにドパミンの SGZ における神経細胞新生に対する影響を検討した研究はあまり多くないが、SGZ はドパミン神経系の投射を受け、ドパミン神経系破壊モデルやパーキンソン病患者の死後脳研究において歯状回の細胞増殖が低下していることから、ドパミンが海馬歯状回の神経細胞新生に重要な役割を果たしていることが示唆されている。当研究室では、成体ラットの海馬歯状回由来神経前駆細胞 (adult dentate gyrus-derived neural precursor cells; ADP) の培養系を確立し、抗うつ薬などの神経細胞新生への影響を研究してきた。そこで本研究では、ドパミンが海馬歯状回の神経細胞新生に与える影響について検討を行った。

【方法と結果】

ADP の単離は、8 週齢 SD ラットからネブタール麻酔下で、断頭し脳を摘出した。摘出した脳は脳スライスチャンパーを用いて、冠状脳切片を作成し、歯状回部分の組織を顕微鏡下で切り出した。組織片は、酵素処理を行い、細胞を単離した。単離した細胞は、percoll 溶液を用いて分画し、目的の画分より ADP を得た。ADP は、無血清下で、B27 supplement (vitamin A-) および basic fibroblast growth factor (bFGF) を含む neurobasal 培地を用いて poly-L-ornirhine/laminin coating dish 上で 37 °C、5% CO₂ の条件で培養を行った。ADP の細胞数は Alamar Blue assay 法により推算し、ドパミン存在下で 3 日間培養することで、対照群に比べ有意に細胞数の増加が認められた。次に、RT-PCR 法により ADP に発現しているドパミン受容体サブタイプ mRNA を確認したところ、D1-D5 の 5 種類すべての受容体サブタイプの発現が確認された。ドパミンによって促進された ADP の増殖は D1-like 受容体アンタゴニストの併用にて拮抗された。一方、D2-like 受容体アンタゴニストは、ドパミンの ADP 増殖促進作用に影響を与えなかった。また、それぞれのアンタゴニスト単独では、ADP の増殖に影響を与えなかった。次に、ドパミン受容体アゴニストの ADP 細胞増殖に及ぼす影響について検討したところ、D1-like 受容体アゴニストである R-(+)-SKF38393 は ADP の増殖を促進した。一方、3 種類の D2-like 受容体アゴニストは、ADP の増殖を促進しなかった。次に 8 週齢 SD ラットの海馬歯状回 神経幹・前駆細胞 (NPC) に対

する 21 日間のドパミン受容体アゴニスト投与の効果を検討した。「増殖」に対する検討では、21 日間の投与後、BrdU を 1 回投与し、「生存」に対する影響については、BrdU 投与翌日から、21 日間投与を行った。薬物の最終投与翌日に、ネンブタール麻酔下で、経心的に灌流固定を実施し、全脳を摘出した。得られた全脳から、海馬を含む厚さ 30 μm の冠状切片を作成し、抗 BrdU 抗体を用いて免疫染色を行った。免疫染色後、顕微鏡下で BrdU 陽性細胞数のカウントを行った。D1-like 受容体アゴニストである ($\pm$)-SKF38393 は、新生細胞の増殖に対しては影響を与えなかったが、新生細胞の生存に対しては促進的に作用した。一方、D2-like 受容体アゴニストである pramipexole は、増殖・生存ともに影響を与えなかった。以上の結果から、ドパミンは D1-like 受容体を介して海馬神経細胞新生に重要な役割を果たしていることが示唆された。本研究のすべては、北海道大学医学研究科動物実験委員会の審査・承認を受け、実験動物の管理と使用に関する指針に則り、行った。

【考察】

ドパミンは、ADP の細胞数を増加させたが、この結果は、ドパミン枯渇モデルやパーキンソン病患者の死後脳で見られる海馬歯状回での NPC 数の減少に矛盾しない結果であった。また、ADP に発現するドパミン受容体サブタイプ発現パターンは、これまでに報告された海馬歯状回に発現しているドパミン受容体サブタイプの発現パターンと一致する結果であった。また、ドパミンによる ADP 増殖促進作用は、予想とは異なり D1-like 受容体を介した作用であり、難治性うつ病などの治療に対して有効性を示す pramipexole や bromocriptine などの D2-like 受容体アゴニストは、ADP の増殖を促進しなかった。さらに、*in vivo* での検討においても海馬神経細胞新生に対して、D2-like 受容体アゴニストが影響を与えなかったことから、ドパミン受容体アゴニストの臨床における抗うつ作用は直接的な海馬神経細胞新生に対する作用によるものではないと考えられた。一方、D1-like 受容体アゴニストは、*in vivo* において増殖には影響しなかったが、新生細胞の生存を促進したことから、ドパミンは D1-like 受容体を介して、海馬神経細胞新生を制御していることが示唆された。現在のところ、D1-like 受容体を介した海馬神経細胞新生制御機構について、詳細なメカニズムは明らかにできていない。今後、下流のシグナルなどを明らかにすることで、抗うつ薬の作用メカニズムの解明や新規抗うつ薬の創製につながる可能性がある。

【結論】

ドパミンは D1-like 受容体を介して、海馬神経細胞新生に対して、促進的に作用することが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 吉 岡 充 弘
副 査 教 授 渡 邊 雅 彦
副 査 教 授 佐々木 秀 直
副 査 教 授 久 住 一 郎

学位論文題名

ドパミンが成体海馬の神経細胞新生に及ぼす影響に関する検討

本論文では、ドパミン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、研究が行われた。成体海馬ラット由来神経前駆細胞 (ADP) の増殖および分化に対するドパミンが及ぼす影響について検討を行った結果、ドパミンが、D1-like 受容体を介して ADP の増殖を促進すること、ドパミンが ADP の神経細胞への分化を促進することを明らかにした。また、D1-like 受容体アゴニストの慢性投与によってラット海馬歯状回の新生細胞の生存を促進するが、神経前駆細胞の増殖には影響しないことを明らかにした。一方で、D2-like 受容体アゴニストは、増殖・生存に対して影響しないことを見出した。これらの結果から、D1-like 受容体が海馬神経細胞新生を作用メカニズムとする新規抗うつ薬のターゲットとなる可能性を示した。

審査会の質疑応答では、佐々木秀直教授より 1) 海馬や海馬神経細胞新生とうつ病の関係、2) パーキンソン病におけるうつ病と海馬神経細胞新生の関係、3) 臨床で使用されている D1-like 受容体アゴニストについての質問があった。1) に対して、うつ病患者の海馬体積の低下が報告されていることから神経細胞新生の低下により萎縮が起きている可能性について、2) に対して 論文中でも示したとおり、パーキンソン病患者では、歯状回において神経前駆細胞の数が減少していることから、海馬神経細胞新生が関与している可能性があることを説明した。また、3) に対して循環器系の薬剤があるが抗うつ効果などの中枢作用については不明と回答した。続いて、渡邊雅彦教授より 4) 海馬神経細胞新生の低下とうつ病がどのように関係しているか、5) *in vitro* と *in vivo* の効果の違いについて *in vitro* の結果が増殖ではなく生存促進を反映している可能性について質問があった。4) に対して、海馬神経細胞新生の低下がどのようなメカニズムでうつ病につながっていくかについては十分わかっていないが、少数ではあるが動物モデルにおいて、海馬神経細胞新生を抑制することでうつ病様行動を示す報告がなされていることについて説明し、5) に対しては、3日間で検討しているため、増殖と考えているが、どれだけ細胞がアポトーシスを起こすか検討したいと回答した。吉岡充弘教授より 6) D1-like 受容体アゴニストが抗うつ効果を有する

のか、7) プラミペキソールの抗うつ効果がD2-like 受容体以外を介している可能性について、8) D1-like agonist の抗うつ薬としての可能性について質問がなされた。6) に対して、本論文中で用いた D1-like 受容体アゴニストが抗うつ作用を示したと報告されていることを説明した。7) に対しては、純粋なD2-like 受容体以外にも親和性を持つ受容体があるため、D2-like 受容体以外を介して抗うつ作用を示す可能性を否定することはできないが、少なくとも本論文の通り、海馬神経細胞新生は関与していないと考えられると回答した。8) に対しては質問 2) での回答にあるように、循環器系の薬剤として使用されていることから、末梢での心血管系に対する副作用の懸念や D1-like 受容体の下流シグナリングをターゲットする可能性、製薬会社の開発状況等を含め説明がなされた。最後に、久住一郎教授より 9) うつ病の各症状と各モノアミンがどのように関係しているかについて質問がなされた。9) に対して、ドパミンは報酬系・喜びに関与していることからやる気・無快樂等に関与すると考えられると回答した。

それぞれの質問に対する申請者の回答は、関連文献からの知識や自らの研究結果に基づき、概ね妥当なものであった。

この論文は、神経前駆細胞の増殖、分化に対してドパミン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。