

学 位 論 文 題 名

セロトニン刺激性血小板内カルシウム
濃度増加反応亢進のメカニズムに関する検討

－気分障害の病態に関連して－

学位論文内容の要旨

近年、双極性障害やメランコリー型うつ病など一部の気分障害患者において、セロトニン (5-HT) 刺激による血小板内カルシウム (Ca) 濃度増加反応 (Ca 反応) が健常者に比較して亢進していることが複数の施設で検証され、概ね一致した結果が得られている。5-HT 刺激による血小板内の Ca 反応は 5-HT_{2A} 受容体を介する反応であり、刺激された 5-HT_{2A} 受容体は中枢神経と同様に Gq 蛋白と共役してフォスファチジルイノシトール 2 リン酸 (PIP₂) の加水分解を促進し、イノシトール 3 リン酸 (IP₃) の産生を導いて細胞内 Ca 貯蔵部位からの Ca 放出を引き起こす。気分障害患者において認められる Ca 反応の亢進が 5-HT_{2A} 受容体数の増加に基づくものなのか、あるいは G 蛋白以降の細胞内情報伝達系の障害によるものなのか未だ明らかではない。

本研究では、まず、未服薬精神疾患患者の血小板を用いて 5-HT 刺激性 Ca 反応亢進所見の疾患特異性を検証した。続いて、Ca 反応亢進のメカニズムを解明する目的で、健常者の血小板を用い、Ca 反応と 5-HT_{2A} 受容体数の相関について検討し、次いで細胞内情報伝達系の二つの主要経路であるプロテインキナーゼ C (PKC) 系及びカルモジュリン (CaM) 系の Ca 反応に対する調節機構について検討した。さらに、気分障害の代表的治療薬であるリチウムの同反応系に与える影響について検討を加えた。

Ca 反応の測定は Kusumi ら¹⁾の方法に従い、血小板を調整後、蛍光 Ca 試薬 fura-2 を加え、蛍光分光光度計 F-2000 を用いて血小板内 Ca 濃度を測定した。10 μM 5-HT 刺激で得られる最大血小板内 Ca 濃度の静止時血小板内 Ca

濃度に対する比(%)あるいは濃度差を反応の大きさの指標とした。5-HT_{2A} 受容体の結合実験は Lysen ら²⁾の方法に従い血小板膜標品を作成し、^[3H]ketanserin により標識される受容体を 5-HT_{2A} 受容体とした。

5-HT 刺激性 Ca 反応は、双極性障害のみが有意に高反応を示し、メラニコリー型大うつ病性障害、非メラニコリー型大うつ病性障害、精神分裂病、パニック障害、強迫性障害、社会恐怖、神経性大食症は健康成人と差が認められなかった。

5-HT_{2A} 受容体数は健康成人の血小板において Ca 反応の大きさとの間に有意な相関は認められなかった。

PKC 刺激薬の PMA は濃度依存性に Ca 反応を抑制し、その IC₅₀ 値は 5.3nM であった。PKC 阻害剤の staurosporine は 100nM、1 μM で Ca 反応をそれぞれ対照の 72.3%、64.9%まで有意に抑制した。さらに特異性の高い PKC 阻害剤である bisindolylmaleimide II も 1 μM、10 μM で Ca 反応をそれぞれ対照の 75.0%、58.1%まで有意に抑制した。

CaM 阻害剤の W-7 は 10-30 μM で、Ca 反応を有意に亢進させた。また、CaM により活性化されるミオシン軽鎖キナーゼの阻害剤である ML-9 は 30 μM で、CaM 依存性蛋白キナーゼ II 阻害剤の KN-93 は 10 μM で Ca 反応を有意に亢進させた。さらに、10mM のリチウム前処置により、30 μM の W-7 により亢進した Ca 反応は有意に抑制された。一方、10mM のリチウム前処置は Ca 反応に対する PMA あるいは staurosporine の作用に影響しなかった。

以上より、5-HT 刺激性 Ca 反応の亢進は精神疾患の中で双極性障害に特異的な所見であること、5-HT 刺激性 Ca 反応の大きさは 5-HT_{2A} 受容体数のみでは規定されないこと、CaM 系の阻害により Ca 反応が亢進しうること、さらには、CaM 阻害による Ca 反応亢進に双極性障害治療薬であるリチウムが拮抗しうることを確認された。

血小板を用いて得られた所見が必ずしも中枢の機能を反映するとは限らないが、今後、双極性障害患者の血小板で CaM 系の機能障害が確認されれば、本研究で得られた所見は、将来、双極性障害病態解明を目的とした研究標的の基礎的資料となり得るであろう。

- 1) Kusumi I et al (1991) Life Sci 48: 2405-2412.
- 2) Leysen JE et al (1983) Eur J Pharmacol 88: 125-130.

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 山 司
副 査 教 授 石 橋 輝 雄
副 査 教 授 吉 岡 充 弘

学 位 論 文 題 名

セロトニン刺激性血小板内カルシウム 濃度増加反応亢進のメカニズムに関する検討

－気分障害の病態に関連して－

双極性障害やメランコリー型うつ病など一部の気分障害患者において、セロトニン (5-HT) 刺激による血小板内カルシウム (Ca) 濃度増加反応 (Ca 反応) が健常者に比較して亢進していることが指摘されている。本研究では、はじめに、未服薬精神疾患患者の血小板を用いて Ca 反応亢進所見の疾患特異性を検証した。続いて、Ca 反応亢進のメカニズムを解明する目的で、健常者の血小板を用い、Ca 反応と 5-HT_{2A} 受容体数の相関について検討し、次いで細胞内情報伝達系の二つの主要経路であるプロテインキナーゼ C (PKC) 系及びカルモジュリン (CaM) 系の Ca 反応に対する調節機構について検討した。さらに、気分障害の代表的治療薬であるリチウムの同反応系に与える影響について検討を加えた。Ca 反応は、様々な精神疾患の中で双極性障害のみで特異的に亢進していた。5-HT_{2A} 受容体数と Ca 反応の大きさとの間に有意な相関は認められなかった。PKC の刺激薬も阻害剤も Ca 反応を亢進させなかったのに対し、CaM 阻害剤、ミオシン軽鎖キナーゼ阻害剤、CaM 依存性蛋白キナーゼ II 阻害剤は Ca 反応を有意に亢進させた。リチウム前処置は CaM 阻害剤による Ca 反応の亢進に拮抗した。以上より、Ca 反応の亢進は双極性障害に特異的な所見であり、そのメカニズムとして CaM 系の機能障害が示唆された。質疑応答では、吉岡教授から、Ca 反応が双極性障害の診断のための客観的指標となる可能性について、また、気分障害の血小板に凝集能など他の機能異常が認められるか否かについて質問があった。これに対して申請者は、Ca 反応の亢進が認められる患者には双極性障害の治療薬が有効であるという当教室の検討結果などを説明し、Ca 反応は診断および治療戦略上有効な指標となり得ることを、また、高血圧患者で気分障害を合併すると心筋梗塞や脳硬塞の罹患率が上昇するという報告などを引用し、気分障害で血小板活性の亢進が存在する可能性について回答した。次

いで石橋教授から、双極性障害にのみ Ca 反応の亢進所見が認められたのは何故か、Ca 反応の亢進が臨床症状と関連するか、CaM の機能低下の病態生理学的意義は何か、双極性障害で PKC のアイソザイムに異常が認められるかについて質問があった。これに対して申請者は、一部の双極性障害で小胞体 Ca-ATPase ポンプの遺伝子異常が指摘されていることを説明し、それが CaM 機能低下および Ca 反応亢進につながる可能性、および、双極性障害の Ca 反応亢進が患者の状態像のいかんにかかわらず認められるという報告を引用して、Ca 反応亢進は直接症状に関連するのではなく、遺伝子で規定された異常を補正している結果としての現象である可能性について述べ、さらに双極性障害患者の血小板や死後脳で PKC のいくつかのアイソザイムの分布や発現量に異常が指摘されているが、これもなんらかの病態を補正している結果であると考えている旨を回答した。さらに小山教授から、双極性障害の病態と関連する候補遺伝子と双極性障害に対する新しい治療薬の可能性について申請者の考えを求められた。これに対して申請者は、双極性障害の病態に関連する候補遺伝子としては Ca-ATPase ポンプなど、その障害に代償機構が働きやすい蛋白の遺伝子が挙げられること、CaM activator や膜安定化作用を有する薬剤など細胞内 Ca 環境を安定させる可能性のある治療薬の開発が望ましい旨意見を述べた。

この論文は、末梢の試料から特定の中樞神経疾患に特異的な所見を見出し、双極性障害の病態に CaM 系の関与という新しい視点を提供したという点で高く評価される。今後、遺伝子研究の進歩と臨床知見の蓄積により、双極性障害の病態解明と治療法がさらに進展することが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院研究科における研鑽と併せ、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。