

学位論文題名

抗うつ剤投与のラット脳ドパミン受容体発現に対する影響

学位論文内容の要旨

抗うつ剤は以前より、セロトニン(5-HT)やノルアドレナリン(NA)の神経終末への再取込み阻害、あるいは神経終末におけるモノアミン酸化酵素阻害により、シナプス間隙の5-HTやNAを増加させることで臨床効果を発揮すると考えられてきた。しかし、動物に抗うつ剤を投与すると、前頭前野の細胞外ドパミン(DA)濃度も増加することが示され、DA作動系も賦活することが示唆されている。さらに抗うつ剤を反復投与すると、apomorphineやmethamphetamineなどDA受容体作動薬による移所運動量増加作用が増強されることから、反復投与によりDA作動系に行動感作が生じると考えられている。分子生物学的研究により、行動感作の機序の1つとして、シナプス後膜におけるドパミン受容体発現の上昇が想定されるようになった。しかし、抗うつ剤反復投与による影響を受ける脳部位やドパミン受容体サブタイプに関しては不明な点が多い。そこで、本研究では、薬理的プロファイルの異なる抗うつ剤をラットに反復投与し、精神機能との関連が想定されている前頭皮質、側坐核、線条体における、ドパミンD1、D2、D3受容体発現に及ぼす影響を、Western blot法とNorthern blot法を用いて検討した。

抗うつ剤としては、5-HTとNAの再取込み阻害薬であるamitriptyline (20mg/kg BW)、選択的NA再取込み阻害薬であるdesipramine (20mg/kg BW)、及び低用量では細胞外DA濃度を増加させることで抗うつ効果を発揮すると考えられているsulpiride (10mg/kg BW)を用い、それぞれ1日1回、腹腔内投与した。最終投与4時間後に断頭し、直ちに前頭皮質、側坐核、線条体を取り出した。

Western blot法には、蛋白膜分画を作製してSDS-PAGEを行い、ニトロセルロース膜に転写した。一次抗体としてウサギ抗ラットD1受容体(D1R)抗体、ウサギ抗ラットD2受容体(D2R)抗体、ウサギ抗ラットD3受容体(D3R)抗体を用いた。二次抗体にはHRP標識抗ウサギIgG抗体を用い、反応後ECLキット™を用いて化学発光させ、特異的シグナルをX線フィルムに露光した。

Northern blot法には、total RNAを精製し、アガロースゲル電気泳動を行い、ナイロン膜に転写した。内部標準としてはGAPDH mRNAを用いた。D1R mRNA、D2R mRNA、GAPDH mRNAに対しては、 $[^{32}\text{P}]$ dCTPで標識したcDNAプローブを作製してハイブ

リダイゼーションを行い、特異的シグナルを X 線フィルムに露光した。D3R mRNA に対しては、 $[^{32}\text{P}]\text{UTP}$ で標識した cRNA プローブを作製してハイブリダイゼーションを行った後、RNaseA で処理し、特異的シグナルを X 線フィルムに露光した。得られたシグナルは、画像解析プログラム MCID-M2 を用いて解析した。なお、D1R, D2R, D3R の mRNA シグナル強度は GAPDH mRNA シグナル強度で補正した。

統計学的解析は、Western blot 解析の結果は、対照群と各薬剤投与群との間で比較し、t 検定を行った。Northern blot 解析の結果は、各群間の比較は一元配置分散分析を行った。いずれも $p < 0.05$ の場合を統計学的に有意とみなした。

Western blot 解析の結果、D1R と D2R はそれぞれの native form のみが検出された。D3R は単量体の他、四量体も検出されたため、それらのシグナル強度を合計して比較検討した。Amitriptyline 投与後、前頭皮質における D2R 蛋白量が有意に増加していたが ($p < 0.05$)、他の部位では変化が認められなかった。D1R, D3R 蛋白量はいずれの部位でも変化がみられなかった。Desipramine 投与後、前頭皮質における D1R 蛋白量が有意に増加していたが ($p < 0.05$)、他の部位では変化が認められなかった。D2R, D3R 蛋白量はいずれの部位でも変化が認められなかった。Sulpiride 反復投与後はいずれの受容体サブタイプ、いずれの部位においても変化が認められなかった。

Northern blot 解析では、D1RmRNA, D2RmRNA はいずれの部位でも検出可能であったが、変化は認められなかった。D3RmRNA は前頭皮質、線条体ではシグナルが非常に微弱であったため、側坐核のみで解析を行ったが、有意な変化はみられなかった。

抗うつ剤反復投与のドパミン受容体発現に対する影響は、しばしば線条体と側坐核で検討され、側坐核で D2R と D3R の mRNA や蛋白発現が亢進するという報告が多いが、前頭皮質で検討した報告はこれまでほとんどない。前頭皮質は、中脳皮質辺縁系ドパミン神経系の投射部位の 1 つであり、情動や意志発動などを司っていると想定されている。Amitriptyline が前頭皮質 D2R 蛋白量を増加させ、desipramine が前頭皮質 D1R 蛋白量を増加させたことは、抗うつ剤が前頭皮質のドパミン神経機能を亢進させることを示唆しているのかも知れない。三環系抗うつ薬である amitriptyline と desipramine が異なるドパミン受容体サブタイプの発現を調節した機序に関しては不明であるが、前者が 5-HT と NA の再取込み阻害を有するのに対して、後者は NA を選択的に再取込み阻害するという、薬理学的プロフィールの違いと関連しているのかも知れない。また、今回の検討で sulpiride ではいずれの部位でもドパミン受容体発現に変化がみられなかったが、sulpiride には 5-HT や NA の再取込み阻害能がないことと関連しているのかも知れない。

前頭皮質は、中脳皮質辺縁系ドパミン神経系の投射部位の一つであり、その機能不全は快楽の喪失や精神運動抑制といったうつ病の中核症状をもたらすと考えられている。本研究で、amitriptyline と desipramine 投与後、前頭皮質のドパミン受容体蛋白量が増加したことは、抗うつ作用と何らかの関連があることが示唆される。しかし、前頭皮質の D1 受容体と D2 受容体の機能に関しては不明な点が多く、さらなる検討が必要と思われた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 山 司

副 査 教 授 吉 岡 充 弘

副 査 教 授 田 代 邦 雄

学 位 論 文 題 名

抗うつ剤投与のラット脳ドパミン受容体発現に対する影響

抗うつ剤は以前より、シナプス間隙のセロトニン(5-HT)やノルアドレナリン(NA)を増加させることで臨床効果を発揮すると考えられてきた。しかし、動物に抗うつ剤を反復投与すると、ドパミン(DA)受容体作動薬による移所運動量増加作用が増強されることから、DA 作動系をも賦活すると考えられるようになった。その機序の1つとして、シナプス後ドパミン受容体発現の上昇が想定されている。本研究では、抗うつ剤の反復投与によるドパミン受容体発現に及ぼす影響を、脳部位別に、各受容体サブタイプに特異的・定量的な方法で検討した。

抗うつ剤としては、5-HT と NA の再取込み阻害薬である amitriptyline (20mg/kg BW), 選択的 NA 再取込み阻害薬である desipramine (20mg/kg BW), 及び低用量では細胞外 DA 濃度を増加させることで抗うつ効果を発揮すると考えられている sulpiride (10mg/kg BW)を用い、それぞれ1日1回、腹腔内投与した。最終投与4時間後に断頭し、直ちに前頭皮質、側坐核、線条体を取り出した。各脳組織より蛋白膜分画、および total RNA を精製し、Western blot 法、Northern blot 法により、ドパミン D1, D2, D3 受容体蛋白量, mRNA レベルを検討した。

Western blot 解析では、amitriptyline 投与後、前頭皮質における D2 受容体(D2R)蛋白量が有意に増加していたが($p < 0.05$), 線条体、側坐核では変化が認められなかった。D1 受容体(D1R), D3 受容体(D3R)蛋白量はいずれの部位でも変化がみられなかった。Desipramine 投与後、前頭皮質における D1R 蛋白量が有意に増加していたが($p < 0.05$), 線条体、側坐核では変化が認められなかった。D2R, D3R 蛋白量はいずれの部位でも変化が認められなかった。Sulpiride 反復投与後はいずれの受容体サブタイプ、いずれの部位においても変化が認められなかった。Northern blot 解析では、D1R mRNA, D2R mRNA はいずれの部位でも検出可能であったが、いずれの薬剤によっても有意差は認められなかった。D3R mRNA は側坐核のみで解析できたが、有意差はみられなかった。

抗うつ剤反復投与のドパミン受容体発現に対する影響は、しばしば線条体と側坐核で検討されているが、前頭皮質で検討した報告はこれまでない。Amitriptyline が前頭皮質 D2R 蛋

白量を増加させ、desipramine が前頭皮質 D1R 蛋白量を増加させたことは、抗うつ剤が前頭皮質のドパミン神経機能に影響を及ぼし、うつ病の症状の一つとしての前頭葉機能の低下を改善している可能性が考えられた。

質疑応答では、吉岡教授から、①抗うつ剤の単回投与による CREB を介した転写亢進の可能性、②前頭前野におけるドパミン D1, D2, D3 受容体の発現比、③D3 受容体の四量体の生体内での働き、④蛋白サンプルに細胞質内蛋白が含まれていないか、⑤抗うつ剤の作用機序において、ドパミン系への影響は最終共通経路か、⑥D1 受容体と D2 受容体のどちらが重要か、について質問があった。これに対して申請者は、①先行研究では単回投与では CREB に変化がなかったこと、②受容体オートラジオグラム法などの報告によると、D1 受容体と D2 受容体は同程度に発現しているが、D3 受容体は比較的少ないこと、③D3 受容体の四量体の機能に関しては、これまで全く議論されておらず、今後の検討に興味をもたれること、④本研究は膜分画のみを精製しており、internalize した蛋白は含まれていないこと、⑤抗うつ剤のドパミン作動系への影響は、薬理作用の重要な一側面をあらわしているとは考えられるが、最終共通経路かどうかは不明であること、⑥D1 受容体と D2 受容体はともに重要であろうことを回答した。次いで田代教授から、desipramine と amitriptyline を用いた動物の行動実験と、bromocriptine と pergolide 以外のドパミン受容体作動薬の抗うつ効果に関して質問があった。これに対して申請者は、移所運動量の研究や強制水泳試験を用いた研究で、抗うつ剤の反復投与でドパミン作動系が賦活されることが報告されていること、ドパミン受容体作動薬である cabergoline がうつに対して有効である可能性が臨床的に考えられていることを回答した。

この論文は、抗うつ剤である desipramine と amitriptyline の反復投与により、前頭皮質ドパミン神経系が賦活される可能性をはじめ示したという点で高く評価される。今後、受容体発現亢進の機序をさらに追究することで抗うつ剤の作用機序が解明され、うつ病の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。