

学位論文題名

リチウム長期投与がラットの記憶形成に及ぼす影響

—ラット前頭皮質におけるドパミンD1受容体の発現促進との関連—

学位論文内容の要旨

リチウム(Li)は双極性障害をはじめ臨床で広く用いられており、その作用機序として種々の細胞内情報伝達系の関与が以前より想定されている。近年では、遺伝子発現や神経可塑性にも影響を及ぼすことが次第に明らかとなってきた。しかし、分子・細胞レベルでの研究に比して、Li が行動レベルに及ぼす影響については未だ十分な検討がなされていない。これまで Li の認知機能に対する影響を調べた臨床研究は少なからずあるが、必ずしも一致した結果には至っていない。また、最近の神経心理学的研究から、双極性障害患者では病相期のみならず寛解期においても認知機能障害の存在が明らかとなってきた。本研究では、Li の認知機能に及ぼす影響を検討するため、Li 慢性投与ラットを用いて、8 方向放射状迷路課題における参照記憶および作動記憶の形成を測定した。また、前頭前野皮質のドパミンD1受容体(D1R)が作動記憶に関連することから、Li による D1R 蛋白および mRNA 発現量の変化を、Western blotting 法ならびに Northern hybridization 法を用いて、ラット前頭皮質、側坐核、線条体で経時的に測定した。

実験には Wistar 系雄性ラットを用いた。Li は飼料に混入して経口投与した (0.2%炭酸 Li 含有飼料)。

記憶形成に関する実験では、放射状迷路課題装置を用いて、参照記憶および作動記憶の学習トレーニングを1日1回(週4~6回)、計18回(28日間)試行した。毎回同じ3本のアームにのみペレットを置き、以下の判定法にしたがって誤選択数を計測した。ペレットの置いてあるアームに入らなかった場合/ペレットの置いていないアームに入った場合を「参照記憶の誤選択」とし、一度入ったアームに再び入った場合を「作動記憶の誤選択」とした。また、Li 慢性投与後の自発運動量、飼料消費時間、体重を測定し、運動機能や動機付けに与える影響も検討した。さらに、D1R の full agonist である SKF82958 (1mg/Kg) を腹腔内投与し、自発運動量の変化を経時的に計測した。

D1R 発現に関する実験に際しては、Li 投与6日、14日、28日後に断頭し、直ちに前頭皮質、側坐核、線条体を取り出して蛋白膜分画および total RNA を精製した。Western blotting 法では、蛋白膜分画を SDS-PAGE 後に poly vinylidene difluoride(PVDF)膜へ転写し、1次抗体としてウサギ抗ラットドパミンD1A受容体ポリクローナル抗体を、2次抗体に horseradish peroxidase 標識抗ウサギ IgG 抗体を使用し、各々24時間反応させた。その後、ECL Kit を用いて化学発光させ、X線フィルムに露光して特異的シグナルを検出した。Northern hybridization 法では、ホルムアルデヒド変性ゲルにて total RNA を電気泳動した後、ナイロン膜へ転写した。その後、D1R cDNA から [α -³²P]dCTP で放射標識した DNA プローブを作成し、ハイブリダイゼーションを行って、特異的シグナルを X 線フィルムに露光した。さらに、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA を内部標準として、各部位での D1R mRNA 量を比較した。Western blotting

法および Northern hybridization 法の結果は、画像解析プログラム MCID-M2 を用いて測定した。

統計学的解析には、対照群と Li 群の二群間比較で Student *t*-test を用い、放射状迷路課題の結果には repeated measure ANOVA を用いた。いずれも、 $p < 0.05$ の場合に統計学的有意とみなした。

8 方向放射状迷路課題において、Li 群では対照群に比べて参照記憶の平均誤選択数が減少し、2 群間で有意な差を認めた。また、参照記憶の平均誤選択数は試行に伴って経時的に有意な減少を示したが、交互作用はみられなかった。一方、作動記憶の平均誤選択数は 2 群間で有意な差はなかったが、交互作用が認められ、試行に伴って経時的に有意な減少を示した。また、Li 慢性投与後に自発運動量、飼料消費時間、体重を測定したが、いずれも 2 群間で有意な差は認めなかった。尚、Li 投与 28 日後の平均血清濃度は $0.47 \pm 0.03 \text{ mEq/L}$ であった。

Li 慢性投与により作動記憶の形成が促進されたことから、脳内ドパミン作動系を介した変化が示唆された。そこで、Li 慢性投与後に SKF8295(1mg/Kg)を腹腔内投与したところ、Li 群および対照群ともに自発運動量は有意に増加した。さらに、Li 群では対照群に比べて SKF82958 投与後の自発運動量が有意に増加していた。

Western blotting 法の結果、前頭皮質の D1R 蛋白発現量は Li 投与 14 日後より有意な増加を示した。側坐核では、両群間で D1R 蛋白発現量に有意な差はみられなかった。線条体における D1R 蛋白量は、Li 投与 6 日後で対照群に比べて有意な減少を認めたが、それ以外では有意な変化はみられなかった。Northern hybridization 法の結果、前頭皮質の D1R mRNA 発現量は、いずれの時点でも有意な差はないが一定して増加傾向を示した。側坐核では 28 日後に有意な減少を認め、線条体においても D1R mRNA 発現量は Li 投与 14 日後より有意な減少を示した。尚、平均血中濃度 (mEq/L) は、6 日、14 日、28 日後でそれぞれ 0.49 ± 0.06 , 0.45 ± 0.04 , 0.35 ± 0.02 であった。

Li 慢性投与がラットの記憶形成に及ぼす影響を検討した報告は、本研究が初めてである。Li 投与群では放射状迷路課題における参照記憶の誤選択数が一定して対照群より少なく、Li は投与初期からラットの参照記憶の形成を促進することが推測された。一方で、作動記憶の誤選択数は投与 1 週間前後より Li 群が逆転して少なくなり、その後も対照群に比して低値を維持した。前頭皮質での D1R 蛋白および mRNA 発現量の変化を考慮すると、Li による D1R 発現亢進が作動記憶の形成に関与している可能性が示唆される。また、感情障害の病態生理の一つに認知機能障害も想定されていることから、Li の作用機序の一つとして D1R を介した作動記憶形成促進作用を新たに想定することもできるが、今後さらなる研究が必要である。

近年の研究から、空間性作動記憶プロセスに前頭前野皮質の D1R の活性化が必要と考えられているが、作動記憶課題の成績と D1R 刺激とは「逆 U 字型」の関係にあり、過剰な活性化はかえって作動記憶を障害する。Li の認知機能に及ぼす影響について、従来の臨床研究では結果は必ずしも一致していないが、全般的に抑制するという報告が多い。一方、今回の結果からラットではむしろ Li は記憶形成を促進することが示唆されたが、この相違には以下の理由が考えられる。① Li 血中濃度が従来の研究よりも低値であり、D1R 発現に差が生じた可能性、② 測定した認知機能の相違 (視空間性と聴覚言語性) が結果に反映された可能性が挙げられる。また、Li が前頭皮質の D1R 発現を増加させたが、その機序として AP-1 や CREB といった転写調節因子の標的 DNA への結合活性を亢進させた可能性が考えられる。また、脳内各部位でのドパミン量が Li 慢性投与によって変化することから、フィードバック機構が D1R 発現を部分的に調節している可能性もある。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 山 司

副 査 教 授 本 間 研 一

副 査 教 授 吉 岡 充 弘

学 位 論 文 題 名

リチウム長期投与がラットの記憶形成に及ぼす影響

－ラット前頭皮質におけるドパミンD1受容体の発現促進との関連－

近年、双極性障害患者においても認知機能障害の存在が明らかとなり、その主たる治療薬であるリチウムの認知機能に及ぼす影響を検討することは治療上有益であると思われる。しかし、従来の臨床研究では必ずしも一致した結果に至っておらず、動物実験で検討した報告も皆無である。本研究では、放射状迷路課題を用いてリチウムがラットの記憶形成に及ぼす影響を行動薬理学的に検討し、さらに、記憶との関連が示唆されるドパミンD1受容体の発現を定量的方法で測定し、リチウムがドパミンD1受容体発現に及ぼす影響についても検討した。

8方向放射状迷路実験において、リチウム群では対照群に比べて参照記憶の平均誤選択数が有意に減少し、両群ともに試行に伴い平均誤選択数は経時的に有意な減少を示したが、交互作用はなかった。一方、作動記憶の平均誤選択数は2群間で有意な差はなかったが、約1週間後よりリチウム群の平均誤選択数が逆転して対照群より少なくなり、交互作用が認められた。作動記憶でも両群ともに試行に伴い平均誤選択数は経時的に有意な減少を示した。尚、リチウム投与による自発運動量、飼料消費時間、体重の変化に有意な差はなく、行動実験に影響を与えないと考えられた。また、リチウム群ではSKF82958投与後の自発運動量が有意に増加しており、リチウム投与によりドパミンD1受容体を介してドパミン作動系が亢進している可能性が示された。さらに、Western blot解析の結果、前頭皮質のドパミンD1受容体蛋白発現量は、リチウム投与14日後より有意な増加を示した。側坐核では何れも有意な差はなく、線条体でもリチウム投与6日後で有意に減少したが、14日後以降で変化はなかった。Northern blot解析では、前頭皮質のドパミンD1受容体mRNA発現量は、有意な差はないがリチウム投与により一定して増加傾向を示した。側坐核ではリチウム投与28日後で有意に減少し、線条体においても14日後より有意な減少を示した。以上の結果から、リチウム投与1～2週間後より作動記憶の形成およびドパミンD1受容体の発現が時間的に一致して促進されることが示された。リチウムの臨床効果が1～2週間で発現し、双極性障害では認知機能障害が存在することを考慮すると、前頭皮質のドパミンD1受容体を介した作動記憶形成促進作用がリチウムの作用機序の一つとして考えら

れた。

質疑応答では、本間教授から、①行動実験における体重制限が2群間の食餌摂取量に影響を及ぼした可能性、②リチウム群でドパミン D1 受容体の発現増加に比べて自発運動量に変化が生じなかった理由、③これに関連して受容体蛋白の発現が細胞膜表面で生じているかどうか、④ドパミン D1 受容体発現量に部位差が生じた原因として 5-HT 神経系が関与している可能性、⑤ドパミン D1 受容体の発現増加はどのニューロンで生じていると考えられるか、についての質問があった。これに対して申請者は、①予備実験でリチウム投与時の食餌摂取量を計測し、両群に等量の食餌を与えて体重制限を行ったこと、②ドパミン D1 受容体の発現増加は前頭皮質でのみ認められ、自発運動量に関連する側坐核では変化がなかったこと、③蛋白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、④リチウムは 5-HT 神経系にも作用し、ドパミン神経系との神経ネットワークを考慮しても、5-HT 神経系の関与は十分に想定されること、⑤過去の報告から後シナプス神経で生じていると予想されること、を回答した。次いで吉岡教授から、①ドパミン D1 受容体発現とグルタミン酸系ニューロンの関連、②作動記憶と異なってリチウム投与初期から参照記憶が促進された機序、③リチウムと長期増強の関連を調べた過去の報告、④有効域以下のリチウム血中濃度で記憶形成に変化が生じた臨床的意義、に関して質問があった。これに対して申請者は、①これまでも報告があり、今後の検討課題としたいこと、②参照記憶には海馬や大脳皮質、コリン神経系の関与などより複雑な神経基盤が想定されており、現段階でその機序は不明であるが、少なくともドパミン D1 受容体との関連はないと考えていること、③直接的な関連を検討した研究はなく、記憶との関連でも報告がないこと、④近年、リチウム維持療法における低濃度の有用性が指摘されており、高濃度では認知障害などの副作用も出現しやすく、本研究はそれを裏付けるものである旨、を回答した。

この論文は、リチウム長期投与が前頭皮質のドパミン D1 受容体を介してラットの記憶形成を促進する可能性を初めて示した、という点で高く評価される。今後、記憶や認知に関する行動薬理学的研究および臨床知見の蓄積により、双極性障害の病態解明や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。