

学位論文題名

双極性障害患者の
血小板内カルシウム動員維持機構に関する検討

—プロテインキナーゼC系との関連について—

学位論文内容の要旨

気分障害の一つである双極性障害（躁うつ病）は、その病態生理として中枢神経系におけるいくつかの細胞内情報伝達機構の異常が想定されている。また、双極性障害の治療薬であるリチウム（Li）やバルプロ酸（VPA）が細胞内情報伝達系に対して共通の作用を有し、気分安定化作用と関連している可能性が注目されている。なかでもプロテインキナーゼC（PKC）は、双極性障害患者の血小板や死後脳において、その機能亢進が報告されている一方、ラット脳や培養神経細胞においては、Li および VPA によってその活性が低下することが確認されており、PKC 系が双極性障害の病態生理に関わっている可能性が示唆される。さらに、双極性障害の病態と PKC の関連性は、細胞内カルシウム（Ca）動態を指標とした研究でも示されている。双極性障害ではセロトニン（5-HT）刺激による血小板内 Ca 濃度増加反応が健常者と比較して亢進していることが、多くの施設で検証されているが、健常者や大うつ病性障害で認められる PKC 阻害薬による 5-HT 刺激性 Ca 反応の抑制が双極性障害では認められないことが報告されている。

本研究では第一に、双極性障害において観察される 5-HT 刺激性 Ca 反応亢進のメカニズムに何らかの PKC 系調節機能障害が関与している可能性を想定し、その治療薬である VPA がこれらの調節系にどのような影響を及ぼしているかについて、健常者の血小板を用いて検討を試みた。また、Ca シグナルのもう一つの重要なカスケードであるカルモデュリン（CaM）系についても同様の検討を試みた。

一方、PI レスポンスを直接介さないような細胞内 Ca 動態については、双極性障害ではこれまでほとんど検討されていない。そのような Ca 動態の調節に関わる重要な因子として、小胞体膜上に存在し、細胞質内から小胞体への Ca の汲み上げを行っている Ca-ATPase pump（sarco-endoplasmic reticulum Ca ATPase: SERCA）に着目した。SERCA の機能は PKC により調節を受けていることが知られており、さらに SERCA2 をコードする ATP2A2 遺伝子は遺伝性皮膚疾患ダリエ病の病因遺伝子として最近注目され、双極性障害との合併がしばしば報告されている。また、ATP2A2 遺伝子が存在する 12 番染色体長腕部位（12q24.1）は、双極性障害との連鎖が報告されている。もし SERCA に機能異常が存在すると仮定すれば、静止時 Ca 濃度に影響がでることが予測されるが、われわれを含め多くの報告では双極性障害の静止時 Ca 濃度には異常がないとされていることから、PKC 系が代償的に駆動することにより静止時 Ca 濃度の恒常性が保持されている可能性もある。これらの可能性を検討する目的で、次の検討として健常者の血小板を用い、Ca-ATPase pump 阻害剤である thapsigargin（TG）を使って、Ca-ATPase pump 阻害による血小板内 Ca 動態への影響を調べるとともに、同反応における PKC 系ならびに CaM 系の関与について検討を加えた。さらに、未服薬気分

障害患者の血小板を用いて、これらの反応について健常者との比較検討を行った。

まず、5-HT 刺激性 Ca 反応に対する VPA の影響に関する検討では、健康成人を対象とした。5-HT 刺激性 Ca 反応の測定は、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 (日立) を用いて行い、10 μ M 5-HT 刺激で得られる Ca 濃度の変化を算出した。VPA を濃度展開の上、30 分間前処置し、同反応に与える影響を検討した。また、PKC 阻害剤として staurosporine (STA), bisindolylmaleimidell (BIS) を、PKC 刺激薬として PMA を用い、CaM 阻害剤として W-7 を、それぞれ 4 分間血小板浮遊液に添加し、VPA 前処置の Ca 反応に対する効果への影響を検討した。

その結果、VPA 単独処置は静止時 Ca 濃度には影響を与えなかったが、5-HT 刺激性 Ca 反応を濃度依存性 (50-1000 μ g/ml) に抑制した。しかし、VPA 前処置によって抑制された 5-HT 刺激性 Ca 反応は、PKC を特異的に阻害するとされる 10 nM STA および 500 nM BIS 添加により有意に回復した。1 nM PMA 単独添加では 5-HT 刺激性 Ca 反応を抑制したが、濃度展開した VPA を前処置後 PMA を添加しても、5-HT 刺激性 Ca 反応は PMA 単独の時と差はなかった。つまり、VPA 単独でみられる Ca 反応の減少は、PKC 刺激に感受性のある Ca 反応の部分が低下したと考えられた。また 30 μ M W-7 の添加は、5-HT 刺激性 Ca 反応を亢進させたが、治療濃度の VPA の前処置によって影響を受けなかった。これらのことから、VPA が PKC 刺激薬様に作用することで、5-HT 刺激性 Ca 反応を抑制する可能性が考えられる。

次に、健常成人を対象として、TG を用いた Ca-ATPase pump 阻害による血小板内 Ca 動態への影響および同反応における PKC 系および CaM 系の影響に関する検討を行った。

Ca 反応の測定は、上述の方法を用い、以下のように TG 及び CaCl₂ 添加による Ca 濃度の変化を算出した。まず、細胞外液に Ca を加えない条件で TG を添加し、Ca-ATP pump 阻害による小胞体からの受動的な Ca 流出 (一過性 Ca 増加反応) を調べた。細胞内 Ca 濃度が定常状態に達した後、さらに細胞外液に 1 mM CaCl₂ を添加することにより容量性 Ca 流入の大きさを検討した。また、W-7, PMA, BIS をそれぞれ濃度展開の上 4 分間添加し、30 nM TG による小胞体からの一過性 Ca 増加反応及び容量性 Ca 流入に与える影響を検討した。

その結果、TG (1 nM-10 μ M) は濃度依存性に一過性の細胞内 Ca 濃度増加を引き起こし、その EC₅₀ は 53 nM であった。また、容量性 Ca 流入は、TG (1-100 nM) の濃度に依存して増加した。

PMA および W-7 の前処置により、TG による一過性 Ca 増加反応及び容量性 Ca 流入はともに濃度依存性に有意に減弱し、逆に、BIS 前処置により、2 つの Ca 反応はともに濃度依存性に有意に増強された。このことより、TG による一過性 Ca 増加反応ならびに容量性 Ca 流入が PKC により抑制性の調節を受け、CaM により促進性の調節を受けることが示唆される。

さらに、TG による血小板内 Ca 動態への影響について気分障害患者の血小板を用いた検討を行った。北海道大学病院精神科神経科の外来を受診した治療歴のない気分障害患者 14 名を対象とし、対照群として年齢、性別をマッチさせた健康成人 14 名を選んだ。採血にあたっては研究の趣旨をよく説明し、文書同意を得た。患者の内訳は双極性障害 4 名、大うつ病性障害 10 名で、米国精神医学会による精神疾患分類 DSM-IV の診断基準に従って診断した。30 μ M W-7, 3 nM PMA, 500 nM BIS をそれぞれ 4 分間添加し、30 nM TG による一過性 Ca 増加反応及び容量性 Ca 流入に与える影響を 3 群間で比較検討した。

大うつ病性障害群、双極性障害群、健常対照群の 3 群間で一過性 Ca 増加反応と容量性 Ca 流入には有意な差は認めなかった。健常対照群において一過性 Ca 増加反応および容量性 Ca 流入が W-7, PMA の添加により有意に抑制され、BIS の添加により有意に増強された所見は、双極性障害群、大うつ病性障害群でも同様であった。しかし、双極性障害群における容量性 Ca 流入は、健常対照群と比較して、PKC 刺激による抑制効果が有意に強く、PKC 阻害による増強効果が有意に弱かった。双極性障害では PKC の活性が亢進しているため、PKC

による容量性 Ca 流入の抑制効果も亢進している可能性が考えられ、今回の所見は双極性障害の病態に PKC 機能亢進が関連しているというこれまでの仮説を支持するものである。

今後さらに症例数を増やし、双極性障害の病態と治療薬の作用機序解明を進めていくことが必要であると考えられる。

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 三 輪 聡 一

学位論文題名

双極性障害患者の 血小板内カルシウム動員維持機構に関する検討

—プロテインキナーゼC系との関連について—

双極性障害（躁うつ病）では、プロテインキナーゼ C (PKC) 系が病態生理に関わっている可能性や、セロトニン (5-HT) 刺激による血小板内カルシウム (Ca) 濃度増加反応が健常者と比較して亢進していることが報告されている。本研究では、双極性障害において観察される 5-HT 刺激性 Ca 反応亢進のメカニズムに PKC 系調節機能障害が関与している可能性を想定し、その治療薬であるバルプロ酸 (VPA) がこれらの調節系にどのような影響を及ぼしているかについて、健常者の血小板を用いて 5-HT (10 μ M) 刺激性 Ca 反応の検討を試みた。その結果、VPA 単独処置は 5-HT 刺激性 Ca 反応を濃度依存性に抑制したが、この抑制効果は PKC 阻害剤の添加により有意に回復した。また、PKC 刺激薬を添加した検討から、VPA 単独でみられるこの Ca 反応の減少は、PKC に関連した作用である可能性が示唆された。次にこれまでほとんど検討されていない PI レスポンスを直接介さない細胞内 Ca 動態、すなわち Ca-ATPase pump (SERCA) に着目し、健常者の血小板を用い、Ca-ATPase pump 阻害剤である thapsigargin (TG) を用い血小板内 Ca 動態への影響を調べた。まず、Ca-ATP pump 阻害による小胞体からの受動的な Ca 流出（一過性 Ca 増加反応）を測定し、細胞内 Ca 濃度が定常状態に達した後、さらに細胞外液に 1mM CaCl₂ を添加することにより容量性 Ca 流入の大きさを検討し、PKC 系の関与についても検討を加えた。さらに、未服薬気分障害患者の血小板を用いて、これらの反応について健常者との比較検討を行った。その結果、TG (1 nM-10 μ M) は濃度依存性に一過性 Ca 増加反応を引き起こし、その EC₅₀ は 53 nM であった。また、容量性 Ca 流入は、TG (1-100 nM) の濃度に依存して増加した。また、2 つの Ca 動員は PKC 系により抑制性の調節を受けることが示唆された。気分障害患者の血小板を用いた検討では、大うつ病性障害群、双極性障害群、健常対照群の 3 群間で 2 つの Ca 動員に有意な差は認めなかったものの、双極性障害群における容量性 Ca 流入では、健常対照群と比較して、PKC 刺激による抑制効果が有意に強く、PKC 阻害による増強効果が有意に弱かった。双極性障害では PKC の活性が亢進しているため、PKC による容量性 Ca 流入の抑制効果も亢進している可能性が考えられた。

質疑応答では、石橋教授から、PKC のどのアイソザイムが関与しているのか、躁状態でもうつ状態でも同じ結果になるのかについて質問があった。これに対し申請者は、血小板 PKC アイソザイムには α 、 β 、 δ 、 ζ が存在し、そのうち今回用いた PKC 刺激薬である PMA に

よって α と β が活性化されることから α と β が関与していること、双極性障害でみられる5-HT 刺激性 Ca 反応の亢進については素因性であることがこれまで報告されているが、SERCAに関連したCa動態については今後の検討課題であることを解答した。次いで三輪教授から、血小板が精神疾患のモデルとなりうるのか、さらに双極性障害ではpreあるいはpostシナプスどちらの異常が想定されているのか、Ca反応はどのCaチャンネルによるのかについて質問があった。これに対し申請者は、血小板には遺伝子配列及び薬理学的特性が中枢と同様な5-HT_{2A}受容体ほかシグナル伝達機構を有し、血小板の機能は部分的に5-HT神経の機能を反映すること、双極性障害では神経内分泌学的な検討から5-HT神経系でのpostシナプスレベルでの機能低下が想定されていること、5-HT刺激性Ca反応では主に小胞体膜上のIP3受容体からのCa流出であること、容量性Ca流入では形質膜上のtransient receptor potentialを介した細胞質へのCa流入が想定されていることを解答した。次いで小山教授から双極性障害ではCa動員の亢進がみられるが、臨床でどのような意味があるのかについて質問があった。これに対し申請者は、この異常は遺伝的に規定されているもので、過度のストレスが小胞体にかかり結果的に疾患への脆弱性や病相の出現頻度などに関わってくる可能性が考えられることを解答した。

この論文は、双極性障害においてPKC活性が亢進しており、VPAはPKC系に作用することでCa情報伝達系を調節する可能性を確認したという点で高く評価される。今後さらに患者サンプルを増やし、双極性障害におけるPKC系の関与と治療薬との関連性が解明され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。