

## 別紙 1

## 博 士 論 文 要 旨

論 文 題 目 : 大脳皮質前頭前野のセロトニン神経系に着目した精神疾患に関する研究-隔離飼育マウスを用いた解析

申 請 者                      平城 陽介                      印

専 攻 分 野                      医療薬学専攻

研究指導分野                      臨床薬学分野

指 導 教 員                      矢部 武士

気分障害、統合失調症、不安障害などの精神疾患は、精神機能の障害に伴う著しい精神的苦痛や社会的機能低下をもたらす慢性疾患である。近年、精神疾患の患者数は急激に増加しており、現代社会において精神疾患はありふれた病気とも言うことが出来る。精神疾患は患者本人に苦痛を与えるだけにとどまらず、その結果として社会に多大な影響も及ぼすことが知られている。このまま精神疾患への対策が講じられなければ、2030 年までに世界経済に最大 16 兆ドルの損失が生じるとの試算もあり、精神疾患への対策は現代社会における最重要健康課題の一つと言える。

現代医療における精神疾患治療の柱の一つが、抗うつ薬や抗精神病薬を用いた薬物療法であるが、既存の治療薬に反応しない患者が一定数存在すること、また副作用など問題点も多く残されている。精神疾患の発症機序や治療薬の作用機序の詳細は未だ不明な部分が多く、より優れた精神疾患治療法を確立するためには、これらの解明が必須であることは言うまでもない。

セロトニン神経系は抗精神病薬、抗うつ薬、抗不安薬など多くの精神疾患治療薬の標的となっているモノアミン神経系であり、精神疾患の発症や治療に強く関与することに疑う余地はない。脳におけるセロトニン神経系は、脳幹の縫線核と呼ばれる領域を起始核とし、各脳領域に神経を投射することが知られている。大脳皮質前頭前野は情動制御において重要な役割を担うが、この領域には背側縫線核からセロトニン神経が投射されており、このセロトニン神経系が精神機能の調節において重要であることが、臨床研究や基礎研究から示唆されている。

本研究では、精神疾患の発症および治療に関わる分子基盤の一端を明らかにすることを目的に、背側縫線核から大脳皮質前頭前野に投射するセロトニン神経系に着目した遺伝子発現解析、行動薬理的解析、エピゲノム解析を行った。

## 第1章 幼少期からの隔離飼育環境が背側縫線核 GABA 神経系の遺伝子発現に及ぼす影響の検討

ヒトゲノム解読以降、精神疾患の原因遺伝子を同定するために、ゲノムワイド関連解析などの網羅的な遺伝子解析が盛んに行われてきた。しかしながら、精神疾患の発症を遺伝子配列の異常のみで説明することは難しく、環境要因のような後天的な条件の寄与が大きいものと考えられる。

マウスを離乳後から 6 週間社会的に隔離した環境下で飼育すると、成熟後に多動、攻撃行動、うつ様行動、不安様行動といった異常行動を示すことから、隔離飼育マウスは環境要因が原因となる精神疾患の分子基盤を解明する上で有用なモデル動物であると考えられている。隔離飼育マウスでは他個体と遭遇することで多動や過剰な攻撃行動などの異常行動を示すが、大脳皮質前頭前野セロトニン神経系の易興奮性がこれらの異常行動の出現に関与することが示唆されている。

そこで本章では、隔離飼育によって引き起こされる大脳皮質前頭前野セロトニン神経系の易興奮性の分子基盤を明らかにすることを目的に、まずセロトニン神経系の興奮制御に重要な役割を担う GABA 神経系について解析を行なった。GABA 関連遺伝子の発現変動について real-time PCR 法を用いて解析した結果、集団飼育マウスと比べて隔離飼育マウスでは、背側縫線核において、GABA<sub>B</sub> 受容体サブユニットの一つである GABA<sub>B1a</sub> の発現量が有意に増加していた。隔離飼育マウスの背側縫線核における GABA<sub>B1a</sub> の発現増加は、タンパク質レベルでも確認された。一方で、他の GABA 神経系関連遺伝子の mRNA 発現量に変化はなかった。また、背側縫線核とは異なり大脳皮質前頭前野では、隔離飼育による GABA<sub>B1a</sub> の発現増加は観察されなかった。そこで、隔離飼育マウスの異常行動における背側縫線核 GABA<sub>B</sub> 受容体の関与を明らかにするために、GABA<sub>B</sub> 受容体リガンドの背側縫線核内投与による行動薬理的解析を行った。その結果、隔離飼育マウスが他個体と遭遇した際に示す多動や攻撃行動は、GABA<sub>B</sub> 受容体アゴニストである baclofen (0.06 nmol) の投与により増悪し、GABA<sub>B</sub> 受容体アンタゴニストである phaclofen (0.3 nmol) の投与により減弱した。

本結果から、隔離飼育による背側縫線核の GABA<sub>B1a</sub> の発現増加が、大脳皮質前頭前野セロトニン神経系の易興奮性に起因する異常行動を引き起こす分子基盤の一端である可能性が示された。

## 第2章 隔離飼育による背側縫線核内の遺伝子発現変動の分子機序解析

第1章において、隔離飼育といった環境要因により、背側縫線核において  $GABA_{B1a}$  の発現量が増加することを明らかとした。近年、環境要因により遺伝子発現が変動する機序として、DNA やヒストンタンパク質の化学的修飾を介した遺伝子発現制御、いわゆるエピジェネティクスが提唱されており、環境要因が原因で発症する疾患の分子基盤の一端であるものとして注目されている。

そこで本章では、背側縫線核における  $GABA_{B1a}$  発現量が環境要因により増加する機序を明らかにすることを目的に、 $GABA_{B1a}$  転写開始点周辺の DNA メチル化やヒストンタンパク質アセチル化について解析を行った。その結果、隔離飼育マウスの背側縫線核では、 $GABA_{B1a}$  転写開始点周辺において、DNA メチル化の減少やヒストンタンパク質アセチル化の増加のような転写促進を推察できるようなエピゲノム修飾の変化が観察された。一方で、大脳皮質前頭前野では、 $GABA_{B1a}$  転写開始点周辺における DNA メチル化状態に変化は見られなかった。また、異常行動が十分に出現していない4週間の隔離飼育マウスでは、背側縫線核における  $GABA_{B1a}$  の発現増加やDNA メチル化の減少は観察されなかった。以上の結果から、隔離飼育により背側縫線核選択的に  $GABA_{B1a}$  遺伝子のエピゲノム修飾が変化すること、 $GABA_{B1a}$  の発現増加やエピゲノム修飾の変化と異常行動の出現には相関関係が見られることが明らかとなった。

本結果から、隔離飼育といった環境要因によるエピゲノム修飾の変化が、背側縫線核における  $GABA_{B1a}$  の発現増加を引き起こす分子基盤であることが示唆された。

## 第3章 背側縫線核－大脳皮質前頭前野間の神経回路に注目した漢方薬の作用機序の解析

本章では、第2章までに見出した背側縫線核の  $GABA_{B1a}$  発現増加と大脳皮質前頭前野セロトニン神経系に着目して、未だ明らかとなっていない漢方薬の作用機序の解明を試みた。本研究では解析対象の漢方薬として、加味温胆湯を選択した。加味温胆湯は古来より不安や不眠に用いられており、臨床研究においてもうつ症状を改善することが報告されている漢方処方である。まず、隔離飼育マウスに加味温胆湯（1000 mg/kg）を14日間投与したところ、隔離飼育マウスが他個体と遭遇した際に示す多動は有意に抑制された。しかしながら、背側縫線核における  $GABA_{B1a}$  の発現増加に改善は見られなかった。そこで次に単回投与でも異常行動が改善するかを確かめるために、加味温胆湯（1000 mg/kg）を投与した1時間後に行動実験を行った。その結果、単回投与においても隔離飼育マウスが他個体と遭遇した際に示す多動や強制水泳試験における無動時間の増加といったうつ様行動が改善した。また、こうした異常行動の改善パターンは選択的セロトニン再取り込み阻害作用を有する抗うつ薬である fluoxetine

に類似していることを見出した。そこで、加味温胆湯が脳皮質前頭前野の細胞外モノアミン量に及ぼす影響を解析したところ、加味温胆湯（1000 mg/kg）は細胞外のノルアドレナリン量やドパミン量には影響を及ぼすことなく、細胞外セロトニン量を選択的に増加させることが明らかとなった。さらに、加味温胆湯構成生薬から1種の生薬を除いて調整した一味抜き処方を用いた検討から、加味温胆湯の抗うつ薬様作用や細胞外セロトニン量増加作用には、構成生薬の一つである竹筴が重要な役割を担うことが示された。そこで、竹筴エキスを単独でも細胞外セロトニン量が増加するかを確認したが、竹筴エキスを単独では細胞外セロトニン量増加作用は観察されず、他の生薬との相互作用が関与する可能性が示唆された。

以上の結果から、加味温胆湯は細胞外セロトニン量を増加させることで抗うつ薬様作用を示すこと、加味温胆湯の細胞外セロトニン量増加作用には竹筴が重要であることが示唆された。

脳皮質前頭前野のセロトニン神経系に着目することで、精神機能における背側縫線核の  $GABA_B$  受容体の重要性、環境要因を基盤とした精神機能異常におけるエピゲノム修飾変化の重要性、漢方薬の作用機序の一端が示された。今後、エピゲノム修飾の制御機構の解明や漢方薬の作用機序に関する知見の集積により、精神疾患の発症および治療に関わる分子基盤の理解が深まり、精神疾患に対する十分な対策へとつながることが期待される。