

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 高村直樹

学位論文題名

ドパミンが成体海馬の神経細胞新生に及ぼす影響に関する検討

【背景と目的】

従来、胎生期や幼若期に起こるとされていた神経細胞新生が、成体においても脳室下帯 (subventricular zone, SVZ) や海馬歯状回の下顆粒細胞層 (subgranular zone, SGZ) に起こることが報告されている。近年の報告により、海馬歯状回で起こるこの神経細胞新生は、抗うつ薬の抗うつ効果や気分障害の病態に関与していることが示唆されている。しかしながら、抗うつ薬がどのように神経細胞新生を制御し、抗うつ効果を発現しているかについては、十分に解明されていない。

ドパミンは、セロトニンやノルアドレナリンとともに気分障害の治療において重要なターゲットとして考えられている。気分障害患者では、一部の所見からドパミン量が低下していることが報告されている。また、ドパミン D2-like 受容体アゴニストであるプラミペキソールやブロモクリプチンは、難治性うつ病に対して有効であることが報告されている。現在までにドパミンの SGZ における神経細胞新生に対する影響を検討した研究はあまり多くないが、SGZ はドパミン神経系の投射を受け、ドパミン神経系破壊モデルやパーキンソン病患者の死後脳研究において歯状回の細胞増殖が低下していることから、ドパミンが海馬歯状回の神経細胞新生に重要な役割を果たしていることが示唆されている。当研究室では、成体ラットの海馬歯状回由来神経前駆細胞 (adult dentate gyrus-derived neural precursor cells; ADP) の培養系を確立し、抗うつ薬などの神経細胞新生への影響を研究してきた。そこで本研究では、ドパミンが海馬歯状回の神経細胞新生に与える影響について検討を行った。

【方法と結果】

ADP の単離は、8 週齢 SD ラットからネブタール麻酔下で、断頭し脳を摘出した。摘出した脳は脳スライスチャンパーを用いて、冠状脳切片を作成し、歯状回部分の組織を顕微鏡下で切り出した。組織片は、酵素処理を行い、細胞を単離した。単離した細胞は、percoll 溶液を用いて分画し、目的の画分より ADP を得た。ADP は、無血清下で、B27 supplement (vitamin A -) および basic fibroblast growth factor (bFGF) を含む neurobasal 培地を用いて poly-L-ornirrhine/laminin coating dish 上で 37 °C、5% CO₂ の条件で培養を行った。ADP の細胞数は Alamar Blue assay 法により推算し、ドパミン存在下で 3 日間培養することで、対照群に比べ有意に細胞数の増加が認められた。次に、RT-PCR 法により ADP に発現しているドパミン受容体サブタイプ mRNA を確認したところ、D1-D5 の 5 種類すべての受容体サブタイプの発現が確認された。ドパミンによって促進された ADP の増殖は D1-like 受容体アンタゴニストの併用にて拮抗された。一方、D2-like 受容体アンタゴニストは、ドパミンの ADP 増殖促進作用に影響を与えなかった。また、それぞれのアンタゴニスト単独では、ADP の増殖に影響を与えなかった。次に、ドパミン受容体アゴニストの ADP 細胞増殖に及ぼす影響について検討したところ、D1-like 受容体アゴニストである R-(+)-SKF38393 は ADP の増殖を促進した。一方、3 種類の D2-like 受容体アゴニストは、ADP の増殖を促進しなかった。次に 8 週齢 SD ラットの海馬歯状回 神経幹・前駆細胞 (NPC) に対

する 21 日間のドパミン受容体アゴニスト投与の効果を検討した。「増殖」に対する検討では、21 日間の投与後、BrdU を 1 回投与し、「生存」に対する影響については、BrdU 投与翌日から、21 日間投与を行った。薬物の最終投与翌日に、ネンブタール麻酔下で、経心的に灌流固定を実施し、全脳を摘出した。得られた全脳から、海馬を含む厚さ 30 μm の冠状切片を作成し、抗 BrdU 抗体を用いて免疫染色を行った。免疫染色後、顕微鏡下で BrdU 陽性細胞数のカウントを行った。D1-like 受容体アゴニストである (\pm)-SKF38393 は、新生細胞の増殖に対しては影響を与えなかったが、新生細胞の生存に対しては促進的に作用した。一方、D2-like 受容体アゴニストである pramipexole は、増殖・生存ともに影響を与えなかった。以上の結果から、ドパミンは D1-like 受容体を介して海馬神経細胞新生に重要な役割を果たしていることが示唆された。本研究のすべては、北海道大学医学研究科動物実験委員会の審査・承認を受け、実験動物の管理と使用に関する指針に則り、行った。

【考察】

ドパミンは、ADP の細胞数を増加させたが、この結果は、ドパミン枯渇モデルやパーキンソン病患者の死後脳で見られる海馬歯状回での NPC 数の減少に矛盾しない結果であった。また、ADP に発現するドパミン受容体サブタイプ発現パターンは、これまでに報告された海馬歯状回に発現しているドパミン受容体サブタイプの発現パターンと一致する結果であった。また、ドパミンによる ADP 増殖促進作用は、予想とは異なり D1-like 受容体を介した作用であり、難治性うつ病などの治療に対して有効性を示す pramipexole や bromocriptine などの D2-like 受容体アゴニストは、ADP の増殖を促進しなかった。さらに、*in vivo* での検討においても海馬神経細胞新生に対して、D2-like 受容体アゴニストが影響を与えなかったことから、ドパミン受容体アゴニストの臨床における抗うつ作用は直接的な海馬神経細胞新生に対する作用によるものではないと考えられた。一方、D1-like 受容体アゴニストは、*in vivo* において増殖には影響しなかったが、新生細胞の生存を促進したことから、ドパミンは D1-like 受容体を介して、海馬神経細胞新生を制御していることが示唆された。現在のところ、D1-like 受容体を介した海馬神経細胞新生制御機構について、詳細なメカニズムは明らかにできていない。今後、下流のシグナルなどを明らかにすることで、抗うつ薬の作用メカニズムの解明や新規抗うつ薬の創製につながる可能性がある。

【結論】

ドパミンは D1-like 受容体を介して、海馬神経細胞新生に対して、促進的に作用することが示唆された。