

2. 疲労及び疲労感の分子・神経メカニズムの解明

2.1. 疲労感の脳担当部位とその役割の解明

2.1.2. 前頭前野セロトニン・ドーパミン系とグルタミン酸神経伝達系の関連

筑波大学・基礎医学系 岡戸信男

(1) 要約

セロトニン関連遺伝子の慢性疲労症候群患者 (CFS) に於ける多型性分布は、対照群に比較してセロトニントランスポーター遺伝子のプロモーターのみに統計学的な差異が見いだされた。一方、哺乳類新規神経ペプチドの候補としてヒドラペプチド Hym176 として明らかにされているペプチドの相同物質が同定された。陽性細胞は視床下部弓状核にあり陽性線維は視床下部や坐座核などに分布していた。Hym176 をラット脳室に投与するとセロトニンとドーパミン脳内動態が変化した。

(2) 研究目的

CFS の発症機構のなかで前頭前野のセロトニン・ドーパミン神経系は、グルタミン酸神経伝達との関連で詳細に検討を要する重要な研究課題である。セロトニン・ドーパミン神経系はこれまでに担当研究者による研究でグルタミン酸神経伝達をはじめとする点对点型神経回路のシナプス数を調節する機能をもつ広範投射系神経系として位置づけられてきた (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7)。1000億もの神経細胞によってできているヒトの脳には広範投射系とされる神経細胞は数万しかないが、それら少数の神経細胞からでた線維は脳全体に広く分布している。コンピューター型の点对点回路とは異なり広範投射系型回路は動物の脳にしかない。

セロトニン・ドーパミンなどの生体アミン系は精神分裂病、うつ病、知的障害など精神機能やこころの病と深くかかわることが知られていた。しかし、生体アミン神経系のもつ新しい調節機構を明らかにしなければ CFS の発症機構の解明には迫れない。数多くの機構のうち現在最も重要と考えられる二つの課題に関して解析を加えることを目的とした。

第一には、従来のリガンドと受容体との機構で作用機序を理解してきたが、その他にセロトニンの作用機序を調節する新しい物質、セロトニントランスポーター (5-HTT) の登場である。セロトニン線維から細胞外に放出されたセロトニンが受容体に作用して機能を発揮している状態のセロトニンを再利用するた

めに、再びセロトニン線維内に運び込み役目をしている。即ち、5-HTT はセロトニンの働きを中断することによりセロトニン機能の調節を行っている。

5-HTT の遺伝子に塩基配列の異なるものが何種類かあることが、1996年にドイツのレッシュらの研究で明らかになった(8)。5-HTT 蛋白を作るための遺伝子のプロモーターに塩基の繰り返しがあり、それが14回繰り返す S (short)と16回の L(long)タイプである。ヒトではSとLが多い。さらにSとLに比べれば頻度は少ないが、18回または20回繰り返す XL (extra long)タイプがある。こうしたことを一般に遺伝子多型性とよんでいる。

5-HTT の多型遺伝子のそれぞれのタイプは、機能を異にしている可能性が示されている。核内の染色体上のDNA情報はメッセンジャーRNAに読みとられる。そしてメッセンジャーRNAは核を出て細胞質に移動して、メッセンジャーRNAに書き移された遺伝情報に基づき、アミノ酸が組み合わさって、それぞれ個別の蛋白質が作られる。プロモーターはDNAからメッセンジャーRNAに情報が読みとられる効率を調節する部位である。L型をもつプロモーターではS型に比べ、読みとり効率が高く、メッセンジャーRNAが多くなり、最終産物の5-HTT蛋白がL型では多量に生産される。従ってL型を持つヒトの脳内では、5-HTT蛋白が多く、細胞外のセロトニンがセロトニン線維内に向かってより多く運ばれ、結果的に細胞外でのセロトニン量が減少して、セロトニンが受容体に作用してセロトニンが機能を果たしづらくなる。XLではどうかというと、現在研究中であり結果はまだ分からないけれども、XL保有者の血液中のセロトニン濃度が低いので、恐らくは脳内濃度も低下していると考えている。慢性疲労症候群でもその発症メカニズムにセロトニンが関わることを示唆される研究がある(9)。そのため本研究の第一の目的はCFSに罹患した患者のセロトニン関連遺伝子の多型性として、5-HTTプロモーター遺伝子の他に5-HTT intron (11/11、11/9、9/9)と2A受容体(A/A、A/G、G/G)の多型性についても検討を加えた。

慢性疲労症候群に関わる発症機構の解明の第2の課題として本研究では次の課題の解明を目的とした。セロトニンとドーパミン線維を送り出す起始核はそれぞれ中脳の縫線核と前被蓋野にある。その両者の起始核の調節機構として未知のペプチドが機能している可能性が考えられる。ペプチドは生体アミンの数千分の1の濃度、グルタメイトに比べれば数十万分の1の濃度しかない極めて少ない濃度でしか存在しない物質である。現在では少量しかない哺乳類新規神経ペプチドの発見には新しい研究戦略が必要とされる。本研究ではその為にヒ

ヒドラペプチドの抗体を利用して哺乳類新規神経ペプチドの探索を試みた。ヒドラは神経系をもつ動物の中で最も原始的な腔腸動物である。このヒドラから網羅的にペプチドを単離する研究が始まり、最終的にヒドラには1300種類のペプチドが存在することが考えられている(10)。本研究ではヒドラペプチドの研究で発見されたペプチドの抗体をマウス脳に免疫組織化学法を施し、その組織学的反応パターンから新規ペプチドの存在を予想し、新規ペプチドの単離を試みた。

(3) 研究方法

1) 疲労症候群患者と対照群でのセロトニン関連遺伝子多型性の分析

血液から genomicDNA を採取して 5-HTT プロモーター、5-HTT intron 2、セロトニン 2A 受容体蛋白をコードする遺伝子を PCR で増やした。この産物を 2% アーガロースゲル電気泳動を行い、多型性を解析した。

2) 新規哺乳類神経ペプチドの探索

抗ヒドラペプチド抗体をマウス脳に用いた免疫組織化学的検索

C 末が PKVamide となっているヒドラペプチドのアミノ酸配列は、Ala-Pro-Phe-Ile-Phe-Pro-Gly-Pro-Lys-Val-amide である。PKVamide を認識するポリクローナル抗体を福岡女子大学小泉修教授より供与された。成体マウスを深麻酔下でザンボニ液により灌流固定して脳を取り出し、数時間の後固定を行う。凍結ミクロトームで 30—40 μm 厚の前額断連続切片を作成した。第一次抗体を 5000—10000 倍の希釈で浮遊切片に作用させ、ABC 法で反応した。反応後、切片をゲラチン処理スライドガラスに張り付け脱水してカバーガラスをかぶせて検鏡した。

新規哺乳類新規神経ペプチドの単離

抗 PKVamide ヒドラペプチド抗体で認識される神経ペプチドを抽出する為に、熱酢酸法により粗ペプチド分画を抽出した。その後、逆相カラム PepMapC18 を用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) と、抗 PKVamide 抗体を用いた競合的 ELISA を組み合わせて精製を行った。HPLC で得られた全ての分画について競合的 ELISA を行い、陽性を示した分画を次の HPLC に使用した。このスクリーニングを三段階行い、強く反応する 1 分画を得て、アミノ酸配列分析を行った。

ウ) ヒドラペプチド PKVamide の哺乳類での生理機能

生理機能を調べる為に PKVamide を尾静脈または側脳室に投与して、15分

— 1 時間後に血中脳下垂体前葉ホルモンの定量を行った。またモノアミン代謝への影響を調べる為に、電気検出器付き HPLC でモノアミンと代謝物の定量を行った。

(4) 研究成果

1) CFS のセロトニン関連遺伝子多型性

セロトニン関連遺伝子の多型性は 5-HTT のみに CFS と対照群との間に統計学的差異が認められた。CFS 57 人、対照群 115 人の血液サンプルから DNA を抽出して、PCR で対象遺伝子部位を増幅して電気泳動で多型性を調べた。CFS の 5-HTT では S と L がそれぞれ 21.9 %、78.1 %であった。対照群では S と L がそれぞれ 13.5 %、85.7 %であり、統計学的に有意差が認められた ($p < 0.05$)。

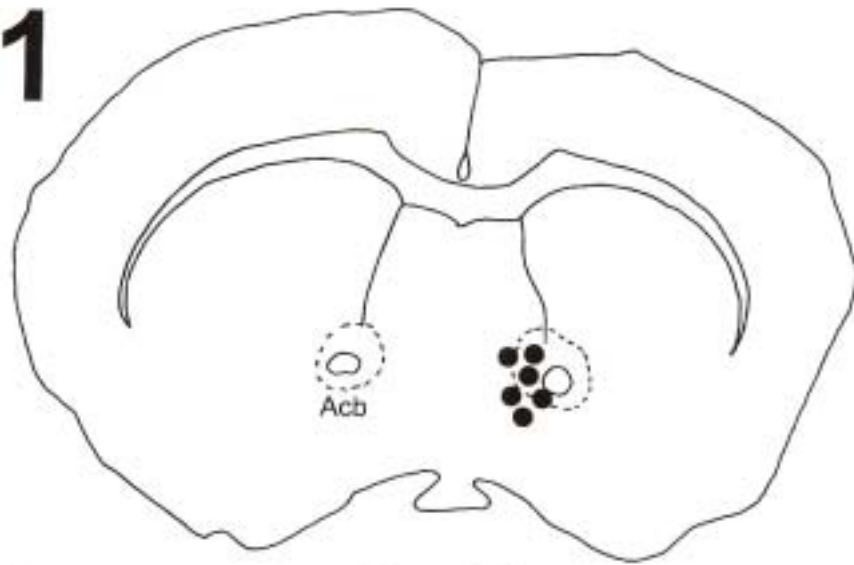
2) 新規哺乳類神経ペプチドの探索

抗ヒドラペプチド抗体をマウス脳に用いた免疫組織化学的検索

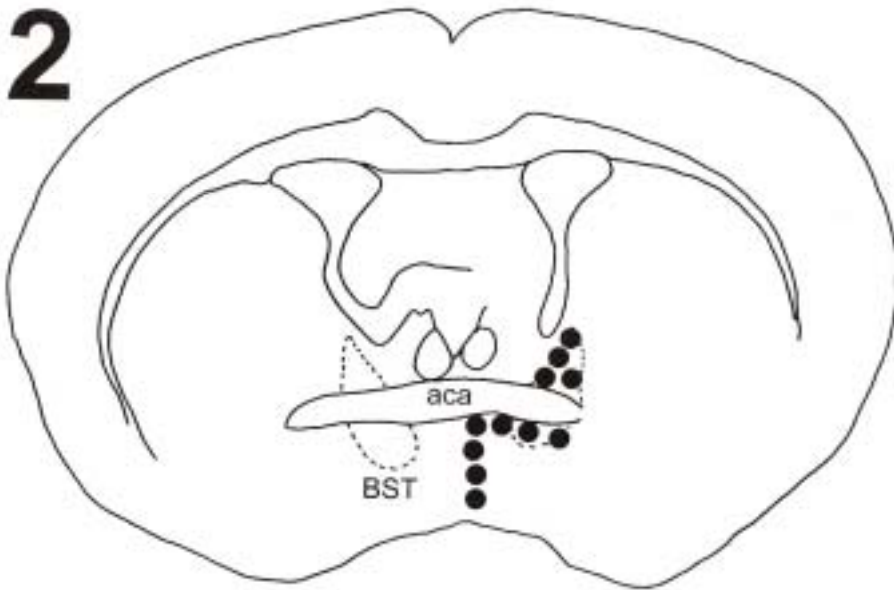
これまでの研究では PKVamide に関する解析が進んでいるので、ここでは PKVamide について述べる。以下のスキームはマウス脳前額断切片で陽性細胞の出現した部位を三角で、陽性線維の観察される部位を丸で表している。切片のスキームは吻側から尾側方向に向かって並べられている。各脳部位を表す略字は以下の部位を表す。

Acb : 坐座核、AH : 視床下部前部、Arc : 弓状核、BMA : 扁桃体基底内側核、BST : 基底核、Ce : 扁桃体中心核、DM : 背内側核、DMPAG : 中心灰白質背内側部、LDTg : 背外側被蓋核、LPAG : 中心灰白質外側部、LS : 外側中殻核、MeA : 内側扁桃体核、MPO : 内側前視索核、Pa : 視床下部室傍核、Pe : 視床下部脳室周囲核、PV : 視床室傍核、VTA : 腹側被蓋野

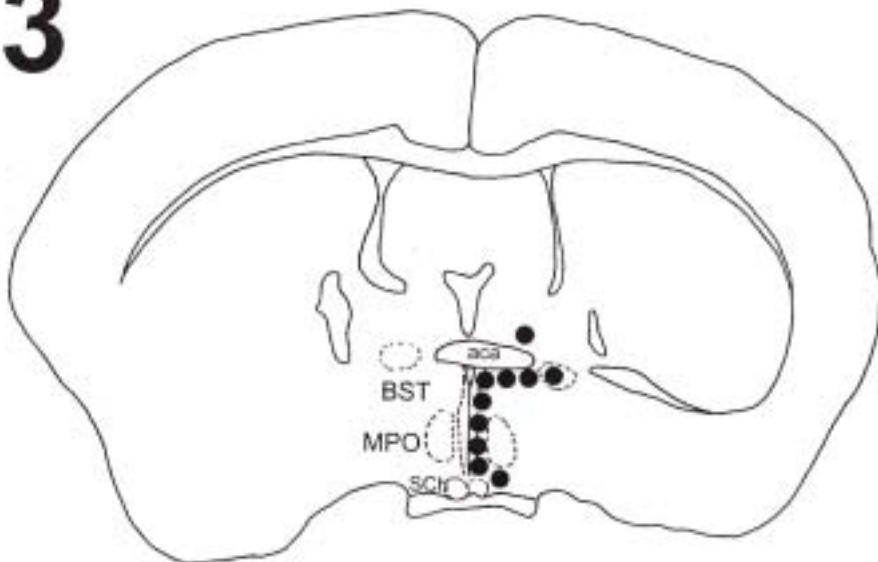
1



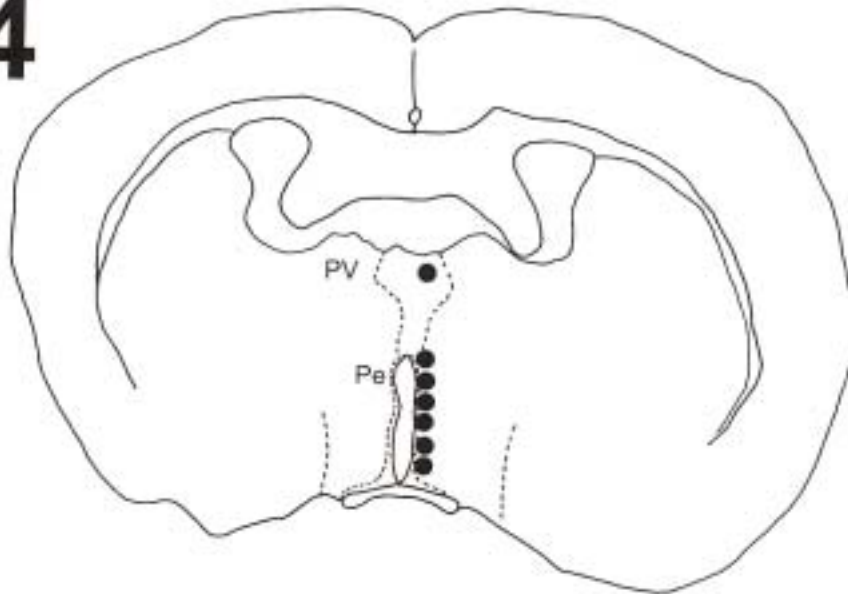
2



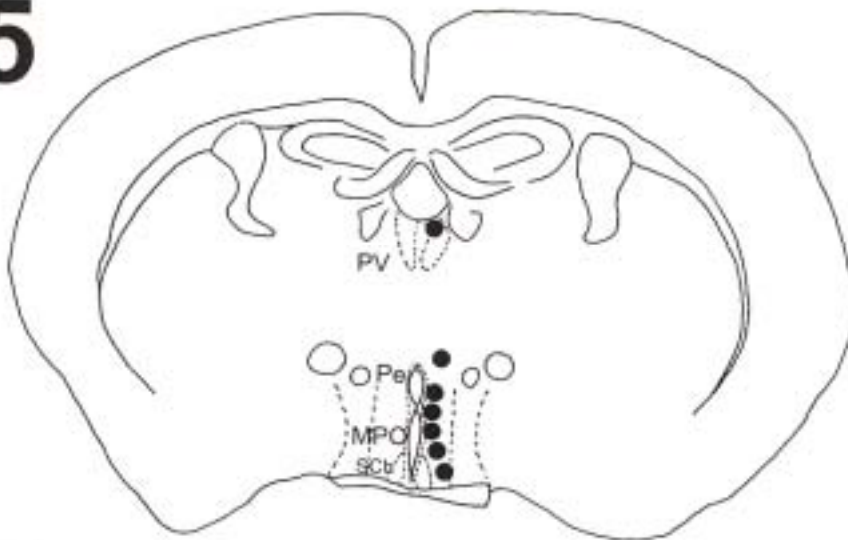
3



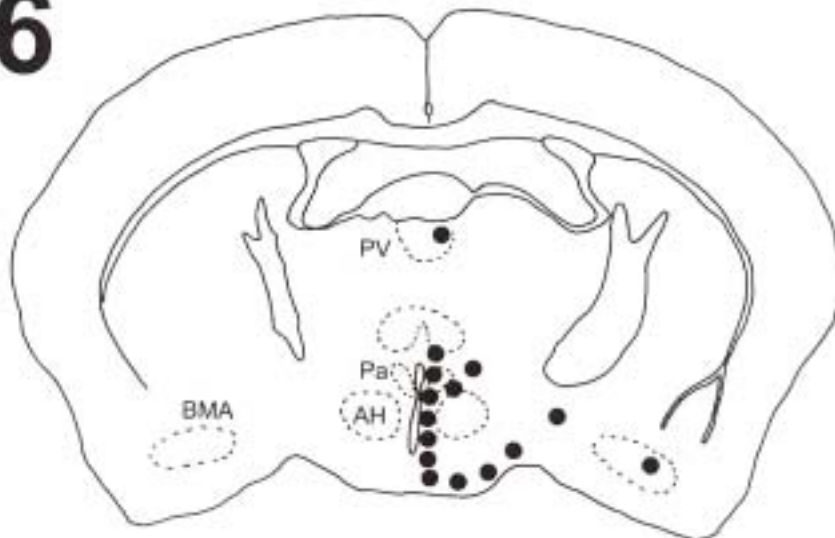
4



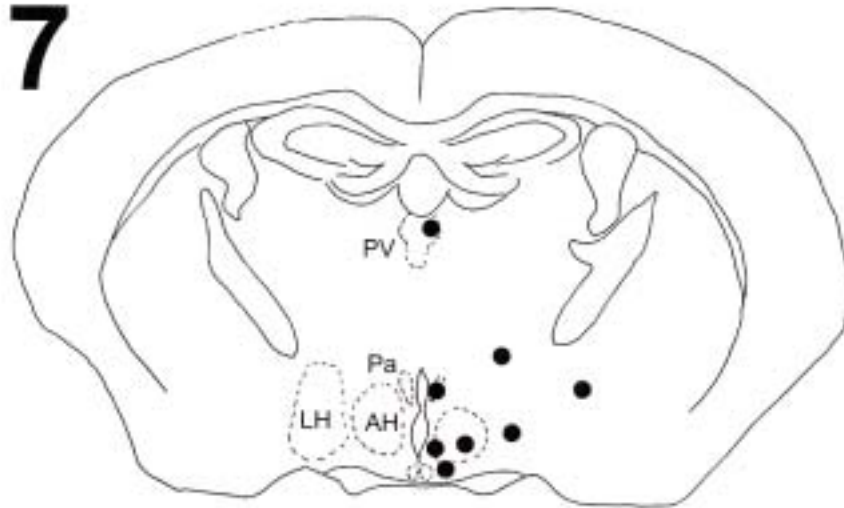
5



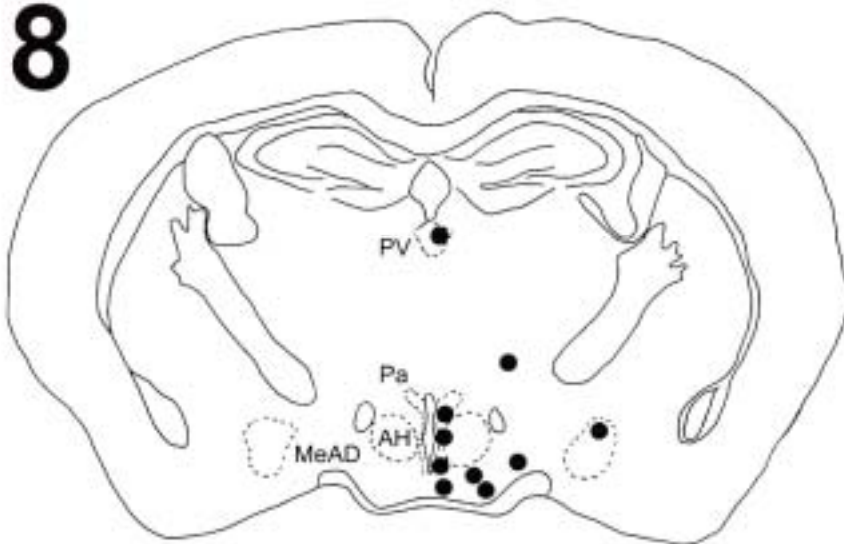
6



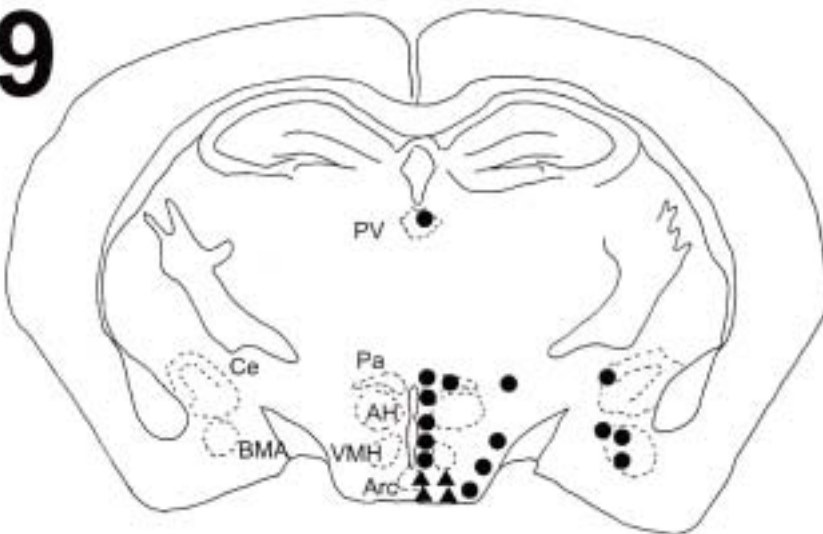
7



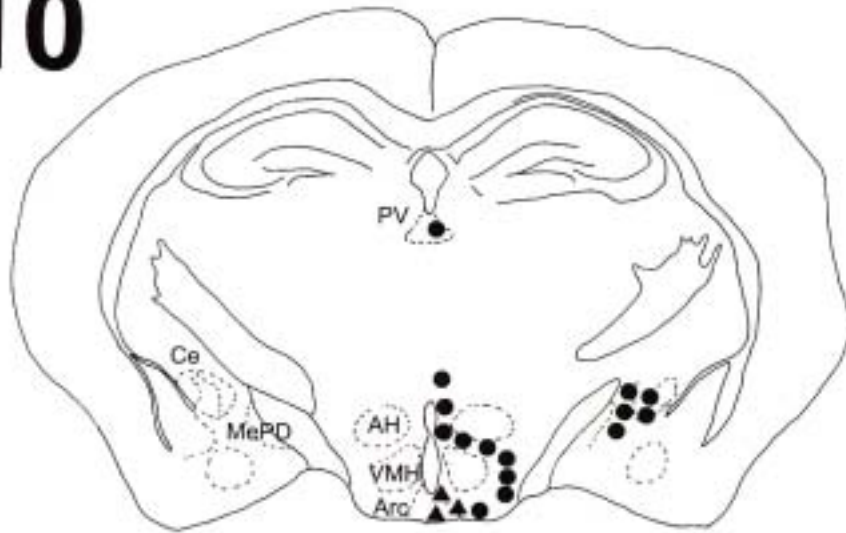
8



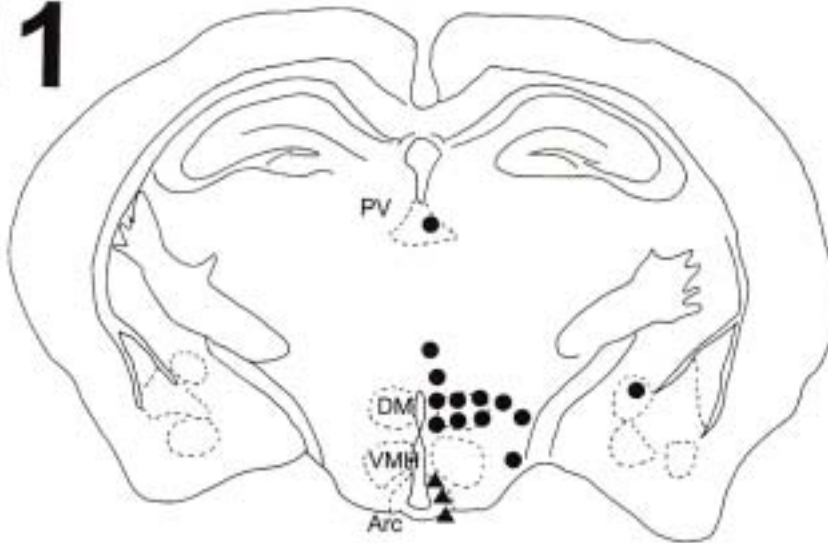
9



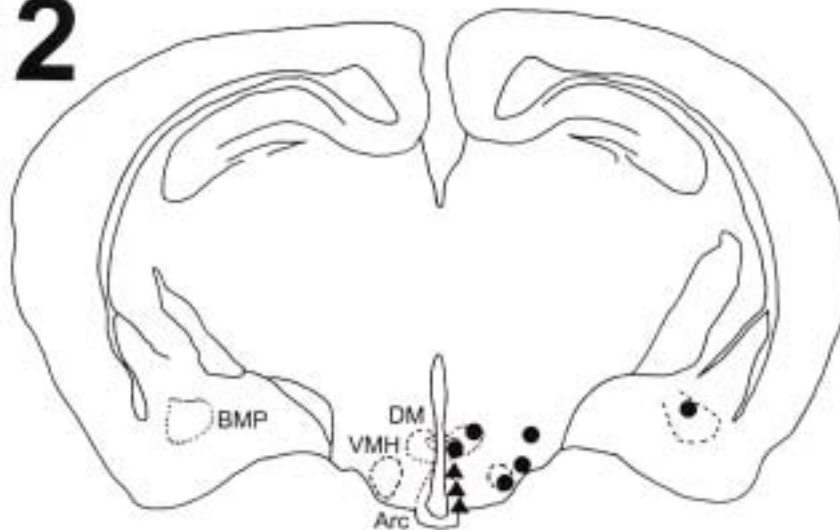
10



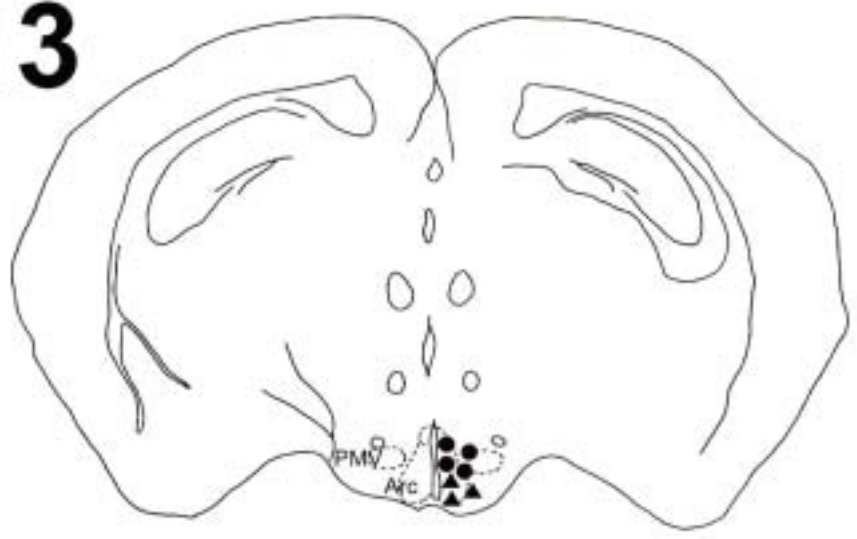
11



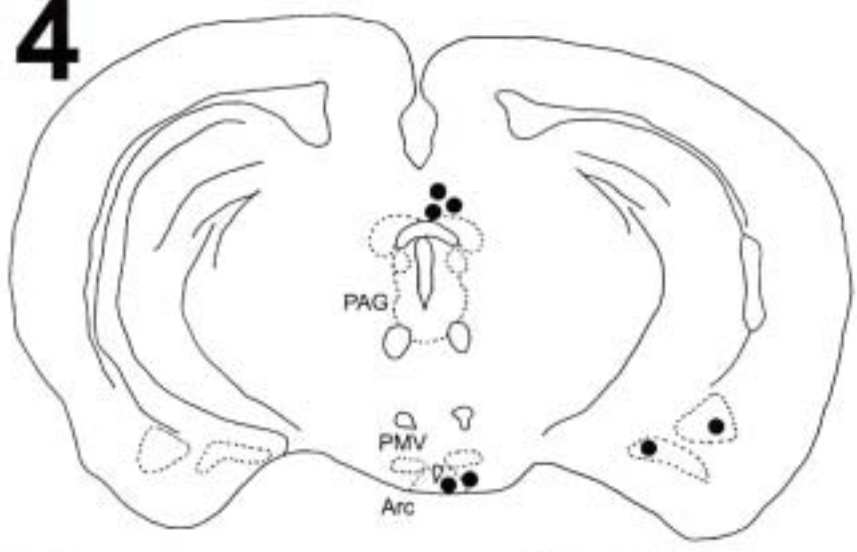
12



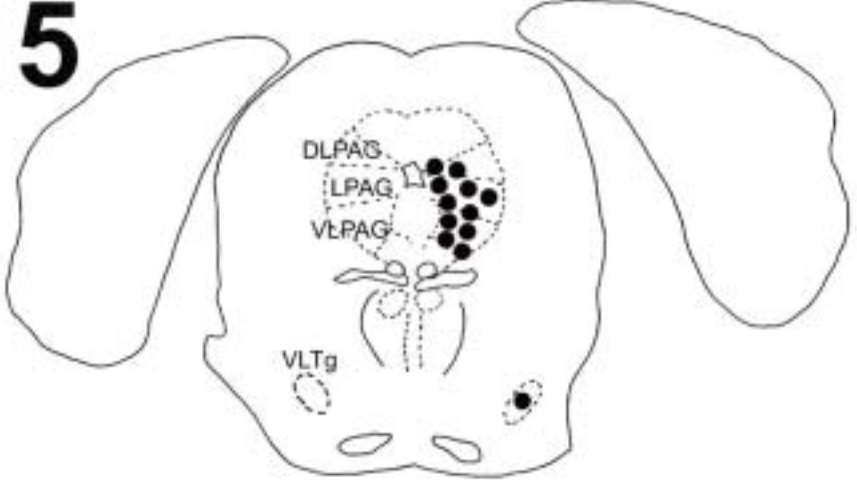
13



14



15



新規哺乳類新規神経ペプチドの単離

第1段階目の精製：粗ペプチド分画を逆相カラムで分画した。各分画の競合ELISAによる免疫活性の測定し、陽性分画を同定した。第一段階の25—31番分画を逆相カラムで分画した結果、競合的ELISAにより9—13分画に免疫活性が認められた。第二段階の9—13分画を逆相カラムで精製した結果、13番分画のアミノ酸配列を決定した。

アミノ酸配列は現在までN末から38残基まで決定した。その結果、既知の蛋白の一部が塩基性アミノ酸が二つ続く部分からプロセッシングされて生じた40残基のペプチドと考えられる。

ウ) ヒドラペプチド PKVamide の哺乳類での生理機能

ヒドラペプチドをラットに投与すると、脳下垂体ホルモンでは成長ホルモンの血中濃度が50%増加した。脳室内への投与では脳内セロトニン濃度が20%低下し、ドーパミン代謝率が2倍に増加した。

(5) 考 察

1) CFSの5-HTT遺伝子多型性のパターンは対照群と有意に異なることが明らかとなった。その結果、CFSの発症にセロトニン神経系が何らかのかたちで関与していることが示唆された。運動後の疲労状態で脳内セロトニン濃度が上昇することから、これまでにCFSへのセロトニンの関与が指摘されてきた。

これまで原因が不明であった乳幼児突然死症候群(SIDS)でも、5-HTTの遺伝子に特徴的な分布があり、セロトニンがその発症機序に重要な役割を果たしていることが、最近発表された我々の研究で明らかにされた(11)。しかし、SIDSでは5-HTTの遺伝的要因に加えて、危険因子とされる環境要因や時期的要因が相加的になって、呼吸中枢での最大の興奮性入力であるセロトニンの機能を低下させることが、発症の要因となると考えられている。CFSでも5-HTTの遺伝的要因に加えて環境要因と時期的要因が発症の基盤をなすと推測される。CFSでは各種のウイルス感染を示す抗体が患者血清中に検出され、ウイルス感染が病態の発症機序の一部であることが指摘されてきた。ウイルス感染が脳内セロトニン濃度を上昇させる要素となっていることを考え合わせるとCFSの発症機序を考える上で興味深い。

2) ヒドラペプチドに対する抗体で免疫陽性反応を示した細胞体と線維の分布は、これまでの報告のある proopiomelanocortin (POMC) とほとんど一致している。しかし、POMC と PKVamide では抗体が認識する C 末の 2—3 アミノ酸の組成が全く異なることから POMC 以外のペプチドである可能性が高い。事実、HPLC で分離したペプチドの配列は POMC とは全く異なることから 40 アミノ酸からなる新しい哺乳類神経ペプチドであると考えられる。

PKVamide の脳室内注入によりセロトニンとドーパミンの脳内濃度が変化したことから、当初目的としたモノアミン系の調節機能を有する新規ペプチドが存在する可能性がある。

ペプチドの脳内濃度はモノアミンの数千分の 1、グルタメイトの数十万分の 1 と極めて微量である。その為に新しいペプチドの発見にはこれまで時として数万頭の動物を使用してきた。しかし、そうした従来の研究戦略では脳の広い部位に比較的多くあるペプチドのみしか発見できなかった。限られた系や少ない部位にある少量のペプチドを見いだすには従来とは異なる新しい戦略が必要になっている。本研究で試みた方法は神経系を持つ動物のうちで最も原始的であるヒドラのペプチドに対する抗体を利用する全く新しい戦略と言える。ヒドラには推定で 1300 種類のペプチドがあり、現在も進んでいる網羅的なヒドラペプチドの単離により、多くの哺乳類神経ペプチドの発見につながる可能性がある。

(6) 引用文献

- (1) Okado, N., Cheng, L., Tanatsugu, Y., Hamada, S., and Hamaguchi, K. Synapse loss following removal of serotonergic fibers in newly hatched and adult chickens. *J. Neurobiol.*, 24: 687-698, (1993)
- (2) Chen, L., Hamaguchi, K., Ogawa, M., Hamada, S., and Okado, N., PCPA reduces both monoaminergic afferents and nonmonoaminergic synapses in the cerebral cortex. *Neurosci. Res.*, 19: 111-115, (1994)
- (3) Niitsu, Y., Hamada, S., Hamaguchi, K., Mikuni, M., and Okado, N., Regulation of synapse density by 5-HT_{2A} receptor agonist and antagonist in the spinal cord of chicken embryo. *Neurosci. Lett.*, 195: 159-162, 1995
- (4) Chen, L., Hamaguchi, K., Hamada, S., and Okado, N., Regional

differences of serotonin-mediated synaptic plasticity in the chicken spinal cord with development and aging. *J. Transplant. Plast.*, 6: 41-48, (1997)

(5) Matsukawa, M., Ogawa, M., Nakadate, K., Maeshima, T., Ichitani, Y., Kawai, N., and Okado, N., Serotonin and acetylcholine are crucial to maintain hippocampal synapses and memory acquisition. *Neurosci. Lett.*, 230:13-16, (1997)

(6) Hayashi, A., Nagaoka, M., Yamada, K., Ichitani, Y., Miake, Y., and Okado, N., Maternal stress induces synaptic loss and developmental disabilities of offspring. *Int. J. Dev. Neuroscience*, 16:209-216, (1998)

(7) Shutoh, F., Hamada, S., Shibata, M., Narita, M., Shiga, T., Azmitia and Okado, N., Long term depletion of serotonin leads to selective changes in glutamate receptor subunits. *Neurosci. Res.*, 38:365-371, (2000)

(8) Lesch K-P, Mosser R Genetically driven variation in serotonin uptake: Is there a link to affective spectrum, neurodevelopmental, and neurodegenerative disorders? *Biol Psychiatry* 44 :179-192 (1998)

(9) Cleare AJ, Bearn J, Allain T, McGregor A, Wessely S, Murray RM, O'Keane V. Contrasting neuroendocrine responses in depression and chronic fatigue syndrome. *J Affect Disord* 34:283-289 (1995)

(10)Takahashi T, Muneoka Y, Lohmann J, Lopez de Haro MS, Solleder G, Bosch TC, David CN, Bode HR, Koizumi O, Shimizu H, Hatta M, Fujisawa T, Sugiyama T. Systematic isolation of peptide signal molecules regulating development in hydra: LWamide and PW families. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:1241-1246 (1997)

(11)Narita N, Narita M, Takashima S, Nakayama M, Nagai T, Okado N Serotonin transporter gene variation is a risk factor for sudden infant death syndrome in Japanese population. *Pediatrics* 107 :690-692 (2000)

(7) 成果の発表

1) 原著論文による発表

ア) 国内誌 (国内英文誌を含む)

Okado N, Narita M, Narita N (2001) A biogenic amine-synapse mechanism for mental retardation and developmental disabilities. *Brain Devel*, 23:S11-S15

イ) 国外誌

(1) Okado N, Narita M, Nartita N (2001) A serotonin malfunction hypothesis by finding clear mutual relationships between several risk factors and symptoms associated with sudden infant death syndrome. *Med Hypoth*, (in press)

(2) Yamaguchi M, Suzuki T, Abe S, Baba A, Hori T, Okado N. (2002) Repeated cocaine administration increases BAGAB(1) subunit mRNA in rat brain. *Synapse* (in press)

(3) Naka, F., Shiga, T., Yaguchi, M., and Okado, N. (2002) Enriched environments increase noradrenaline contents in the mouse brain. *Brain Res.* 924:124-126

(4) Abe S, Suzuki T, Ito T, Yamaguchi M, Baba A, Hori T, Kurita H, Shiraishi H, Okado N. (2001) Effects of single and repeated phencyclidine administration on the expression of metabotropic glutamate receptor subtype mRNAs in rat brain. *Neuropsychopharmacology.* 25(2):173-184.

(5) Sakata-Haga H, Kanemoto M, Maruyama D, Hoshi K, Mogi K, Narita M, Okado N, Ikeda Y, Nogami H, Fukui Y, Kojima I, Takeda J, Hisano S. (2001) Differential localization and colocalization of two neuron-types of sodium-dependent inorganic phosphate cotransporters in rat forebrain. *Brain Res.* 902(2):143-55.

(6) Narita N, Narita M, Takashima S, Nakayama M, Nagai T, Okado N. (2001) Serotonin transporter gene variation is a risk factor for sudden infant death syndrome in the Japanese population. *Pediatrics.* 107(4):690-2.

(7) Maxishima M, Shiga T, Shutoh F, Hamada S, Maeshima T, Okado N. (2001) Serotonin 2A receptor-like immunoreactivity is detected in astrocytes but not in oligodendrocytes of rat spinal cord. *Brain Res.* 889(1-2):270-3.

(8) Shutoh F, Hamada S, Shibata M, Narita M, Shiga T, Azmitia EC, Okado N (2000) Long term depletion of serotonin leads to selective changes in

glutamate receptor subunits. *Neurosci Res.* 38(4):365-71.

(9) Yamaguchi M, Suzuki T, Abe S, Baba A, Ito T, Okado N. (2000) Time-course effects of a single administration of cocaine on receptor binding and subunit mRNAs of GABA(A) receptors. *Brain Res Mol Brain Res.* 81(1-2):155-63.

(10) Masuda T, Okado N., Shiga T. (2000) The involvement of axonin-1/SC2 in mediating notochord-derived chemorepulsive activities for dorsal root ganglion neurites. *Dev Biol.* 224(2):112-21.

(11) Ikemoto K, Nishimura A, Okado N., Mikuni M, Nishi K, Nagatsu I. (2000) Human midbrain dopamine neurons express serotonin 2A receptor: an immunohistochemical demonstration. *Brain Res.* 853(2):377-80.

(12) Maeshima, T., Ito, R., Matsukawa, M., Usuba, M., and Okado, N., (1999) The central distribution pattern of primary afferent fibers innervating the thigh muscle posterior iliotibialis in the chicken. *J. Brain Res.*, 3:389-390

2) 原著論文以外による発表(レビュー等)

ア) 国内誌(国内英文誌を含む)

発表者名:「発表題名」、発表誌名等〔誌名、掲載号、(掲載年)〕

イ) 国外誌

発表者名:「発表題名」、発表誌名等〔誌名、掲載号、(掲載年)〕

3) 口頭発表

ア) 招待講演

岡戸信男: Synaptic Plasticity by Biogenic Amines、*Experimental Biology* 99, 1999年4月17日 Washington DC, Symposium on Regulatory mechanisms underlying adult rat and human brain dynamics

岡戸信男: 生体アミンによるシナプスの形成維持機能動物学会、平成11年9月26日、山形大学

岡戸信男: 情動とセロトニン、平成11年度 JST 異分野研究者交流促進事業ワークショップ「脳のこころ」、平成11年9月22日 湘南国際村センター

岡戸信男：生体アミンによるシナプスの形成維持、平成11年度 JST 異分野研究者交流促進事業 ワークショップ 「情と意」 平成11年10月10日 大磯プリンスホテル

岡戸信男：Synaptic Mechanism for Mental Retardation and Developmental Disabilities、Science Frontier Tsukuba 999、平成11年11月18日 筑波国際会議場

岡戸信男：The Early Lesions of the Aminergic Neurons and Behavior、レット症候群 2000 国際会議サテライトシンポジウム、平成12年7月24日、軽井沢プリンスホテル

岡戸信男：The Synaptic Mechanism for Developmental Disabilities、平成12年度 JST 異分野研究者交流促進事業 ワークショップ、「脳を育む、学習の科学、平成11年度11月24日、大磯プリンスホテル

岡戸信男：生体アミン神経系の機能障害から子供の脳を守る：精神遅滞・発達障害と乳幼児突然死症候群の発症機構、第1回日本赤ちゃん学会、シンポジウム：3歳児神話を検証する、基礎医学の立場から、平成13年4月10日、早稲田大学国際会議場

イ) 応募・主催講演等

Hamada S, Narita M, Okado N. (1999) Identification of rat cerebellar subtype of serotonin 2A receptor. Abst Soc Neurosci 484.6

Masuda T, Okado N, Shiga T. (1999) Involvement of axonin-1/SC2 in mediating the notochord-derived chemorepulsive activities for dorsal root ganglion axons. Abst Soc Neurosci, 511.3

Shutoh F, Hamada S, Narita M, Okado N (1999) Ketanserin modulates GluR2/3 receptor expression in the rat cerebral cortex. Abst Soc Neurosci 710.3

Yaguchi M, Narita M, Maeshima T, Shutoh F, Okado N. (2000) Evaluation of 5-hydroxytryptamine metabolism in the brain of apolipoprotein E-deficient mice. Abst Soc Neurosci, 665.13

Yaguchi M, Ishihara I, Shiga T, Okado N. (2001) Spacial Working memory was maintained in mature rats by noradrenaline removal. Abst Soc Neurosci, 77.13

4) 特許等出願等

出願年月日、「出願名称」、出願者氏名、特許等番号

5) 受賞等

受賞者名 : 「件名」、受賞年月日等