

( 続紙 1 )

京都大学	博士 (薬学)	氏名	永安 一樹
論文題目	縫線核脳切片培養系を用いた依存性薬物および抗うつ薬のセロトニン神経への作用に関する研究		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>セロトニン (5-HT) 神経は、MDMAなどの依存性薬物や、抗うつ薬など向精神薬の主な作用点の一つとなっている。しかしながら、5-HTを検知可能なレベルで遊離するin vitro実験系は今まで存在せず、これら薬物が5-HT神経に急性あるいは慢性にどのような影響を与えるかという知見はほとんど得られていない。そこで、本研究では、組織培養法の一つである脳切片培養系に着目し、機能的な5-HT神経を含有する縫線核脳切片培養系を確立した。その上で、依存性薬物および抗うつ薬の急性および持続処置時の5-HT神経機能変化について解析し、以下の新知見を得た。</p> <p><b>【第1章】 縫線核脳切片培養系の確立とMDMAの作用解析</b></p> <p>縫線核脳切片培養系は、新生ラット (P2-3) より、縫線核を含有する厚さ350 <math>\mu\text{m}</math>の冠状切片を気液界面にて14-16日間培養することで作製した。5-HT神経のマーカであるTPHの免疫染色の結果、本培養系が5-HT神経を豊富に保持していることが明らかとなった。MDMAは、5-HT神経を主な作用点とする依存性薬物であり、急性には5-HTトランスポーター (SERT) を介した逆輸送により5-HTの遊離を引き起こす。本培養系へのMDMAの急性処置 (1-1000 <math>\mu\text{M}</math>) は、濃度依存的な5-HT遊離上昇を引き起こし、この作用はSERT阻害薬のcitalopramの存在下で消失した。一方、MDMAの4日間の持続処置 (300 <math>\mu\text{M}</math>) および1日間の退薬後、低濃度のMDMA (10 <math>\mu\text{M}</math>) により処置を行うと、持続処置を行った群では、行っていない群に比して約4倍の5-HT遊離が観察された。この増強した5-HT遊離は、citalopramによって抑制されず、開口放出の阻害薬により抑制されたことから、活動電位に依存した開口放出による5-HTの遊離が増加していることが示唆される。さらにこの開口放出による5-HT遊離の増強はAMPA受容体の阻害薬により抑制されたことから、AMPA受容体の過感受性が本現象の背景にあると考えられる。</p> <p><b>【第2章】 抗うつ薬の持続処置が縫線核脳切片培養系中のセロトニン神経に与える作用の解析</b></p> <p>選択的セロトニン再取り込み阻害薬 (SSRI) などの抗うつ薬はうつ病の治療に広く用いられる薬物であるが、治療効果の発現に数日から数週間を要する背景にある機構については、不明な点が多い。SSRIであるcitalopram, paroxetine, fluoxetine (0.1-10 <math>\mu\text{M}</math>) の本培養系への単回処置は、細胞外5-HT濃度をわずかに上昇させた。一方、これら薬物を4日間培地中に添加した後に再度、単回処置を行ったところ、顕著な細胞外5-HT濃度の上昇が観察された。この増強は、細胞外カルシウムイオンおよび活動電位依存的であったことから、5-HTの開口放出が増加したためであると考えられた。これまで仮説として</p>			

提唱されていた抑制性の5-HT自己受容体の脱感作について検討を行ったところ、これら受容体の脱感作は5-HT遊離の増加に有意な影響を与えていないことが示唆された。また、AMPA受容体阻害薬により有意に抑制されたことから、本現象は、AMPA受容体の活性化による5-HTの開口放出が増加したために引き起こされると考えられた。次に、他の抗うつ薬（SNRI、三環系抗うつ薬、ノルアドレナリン・セロトニン作動性抗うつ薬（NaSS A））の持続処置がSSRI同様の遊離増強を引き起こすか否かの検討および化合物間の作用強度の比較解析を行った。検討を行った9薬物中7薬物の持続処置により、SSRI同様の5-HT遊離の増強が引き起こされた。5-HT遊離の増強を引き起こした薬物が共通してSERT阻害活性を有していたことから、SERTの持続的な阻害が5-HT遊離の増強に重要であることが示唆される。また、一連の薬物の中で、SNRIであるmilnacipranのみがcitalopramに比して有意に大きな5-HT遊離増強を引き起こし、 $\alpha_1$ アドレナリン受容体阻害薬であるbenoxathianの存在下では、citalopramと同程度の作用に減弱したことから、milnacipranはcitalopramが有する5-HT遊離増強作用に加えて、 $\alpha_1$ 受容体依存的な5-HT遊離の上昇を引き起こすことでさらなる5-HT遊離を引き起こしていることが示唆される。

### 【第3章】 うつ病治療における併用薬が縫線核脳切片培養系からのセロトニン遊離に与える影響

近年、うつ病および周辺症状の緩和を目的として抗うつ薬に加え抗精神薬であるolanzapineやbenzodiazepineが用いられているが、これら薬物の5-HT神経への作用に関する研究はほとんど行われていない。そこで、これら薬物が5-HT神経に対して与える作用について検討を行った。Olanzapineの急性処置は、単独でも5-HT遊離を引き起こしたがその量はわずかであった。ところが、SSRIの存在下では単回処置においても顕著な5-HTの遊離を引き起こした。この作用はGABA<sub>A</sub>受容体阻害薬の存在下で減弱したことから、抑制性のGABA神経の抑制、すなわち脱抑制が、その背景にあることが示唆される。また、benzodiazepineはolanzapineによる5-HTの遊離のみならず、SSRI持続処置により引き起こされた5-HT遊離増強をも、単回の共処置で有意に抑制したことから、benzodiazepineがこれら抗うつ薬の5-HT遊離作用に対して拮抗的に作用することが示唆される。

以上、著者は、縫線核脳切片培養系を用いた5-HT神経活動の評価系を確立し、依存性薬物MDMA、臨床上用いられる抗うつ薬および近年使用が拡大している抗精神薬と抗うつ薬の併用が5-HT神経機能を上昇させ、それらの背景に開口放出を介した5-HTの遊離上昇があることを明らかにした。本研究成果は、依存性薬物および抗うつ薬の作用機構において、グルタミン酸やノルアドレナリン、GABAといった様々な神経系と5-HT神経との相互作用が重要な役割を果たすことを示唆するとともに、縫線核脳切片培養系の、5-HT神経機能評価系としての有用性を示唆するものである。これらの知見は、依存性薬物および抗うつ薬の作用機構の解明と、新規抗うつ薬の創製に有用な基礎的知見を提供するものである。

(続紙 2 )

(論文審査の結果の要旨)

セロトニン (5-HT) 神経は、MDMAなどの依存性薬物や、抗うつ薬など向精神薬の主な作用点の一つとなっている。しかしながら、5-HTを検知可能なレベルで遊離するin vitro実験系は今まで存在せず、これら薬物が5-HT神経に急性あるいは慢性にどのような影響を与えるかという知見はほとんど得られていない。そこで、本研究で申請者は、組織培養法の一つである脳切片培養系に着目し、機能的な5-HT神経を含有する縫線核脳切片培養系を確立した。その上で、依存性薬物および抗うつ薬の急性および持続処置時の5-HT神経機能変化について解析し、以下の新知見を得た。

**【第1章】 縫線核脳切片培養系の確立とMDMAの作用解析**

縫線核脳切片培養系は、新生ラット (P2-3) より、縫線核を含有する厚さ350  $\mu\text{m}$ の冠状切片を気液界面にて14-16日間培養することで作製した。5-HT神経のマーカであるTPHの免疫染色の結果、本培養系が5-HT神経を豊富に保持していることが明らかとなった。MDMAは、5-HT神経を主な作用点とする依存性薬物であり、急性には5-HTトランスポーター (SERT) を介した逆輸送により5-HTの遊離を引き起こす。本培養系へのMDMAの急性処置 (1-1000  $\mu\text{M}$ ) は、濃度依存的な5-HT遊離上昇を引き起こし、この作用はSERT阻害薬のcitalopramの存在下で消失した。一方、MDMAの4日間の持続処置 (300  $\mu\text{M}$ ) および1日間の退薬後、低濃度のMDMA (10  $\mu\text{M}$ ) により処置を行うと、持続処置を行った群では、行っていない群に比して約4倍の5-HT遊離が観察された。この増強した5-HT遊離は、citalopramによって抑制されず、開口放出の阻害薬により抑制されたことから、活動電位に依存した開口放出による5-HTの遊離が増加していることが示唆される。さらにこの開口放出による5-HT遊離の増強はAMPA受容体の阻害薬により抑制されたことから、AMPA受容体の過感受性が本現象の背景にあると考えられる。

**【第2章】 抗うつ薬の持続処置が縫線核脳切片培養系中のセロトニン神経に与える作用の解析**

選択的セロトニン再取り込み阻害薬 (SSRI) などの抗うつ薬はうつ病の治療に広く用いられる薬物であるが、治療効果の発現に数日から数週間を要する背景にある機構については、不明な点が多い。SSRIであるcitalopram, paroxetine, fluoxetine (0.1-10  $\mu\text{M}$ ) の本培養系への単回処置は、細胞外5-HT濃度をわずかに上昇させた。一方、これら薬物を4日間培地中に添加した後に再度、単回処置を行ったところ、顕著な細胞外5-HT濃度の上昇が観察された。この増強は、細胞外カルシウムイオンおよび活動電位依存的であったことから、5-HTの開口放出が増加したためであると考えられた。これまで仮説として提唱されていた抑制性の5-HT自己受容体の脱感作について検討を行ったところ、これら受容体の脱感作は5-HT遊離の増加に有意な影響を与えていないことが示唆された。また、AMPA受容体阻害薬により有意に抑制されたことから、本現象は、AMPA受容体の活性

化による5-HTの開口放出が増加したために引き起こされると考えられた。次に、他の抗うつ薬（SNRI、三環系抗うつ薬、ノルアドレナリン・セロトニン作動性抗うつ薬（NaSSA））の持続処置がSSRI同様の遊離増強を引き起こすか否かの検討および化合物間の作用強度の比較解析を行った。検討を行った9薬物中7薬物の持続処置により、SSRI同様の5-HT遊離の増強が引き起こされた。5-HT遊離の増強を引き起こした薬物が共通してSERT阻害活性を有していたことから、SERTの持続的な阻害が5-HT遊離の増強に重要であることが示唆される。また、一連の薬物の中で、SNRIであるmilnacipranのみがcitalopramに比して有意に大きな5-HT遊離増強を引き起こし、 $\alpha_1$ アドレナリン受容体阻害薬であるbenoxathianの存在下では、citalopramと同程度の作用に減弱したことから、milnacipranはcitalopramが有する5-HT遊離増強作用に加えて、 $\alpha_1$ 受容体依存的な5-HT遊離の上昇を引き起こすことでさらなる5-HT遊離を引き起こしていることが示唆される。

### 【第3章】 うつ病治療における併用薬が縫線核脳切片培養系からのセロトニン遊離に与える影響

近年、うつ病および周辺症状の緩和を目的として抗うつ薬に加え抗精神薬であるolanzapineやbenzodiazepineが用いられているが、これら薬物の5-HT神経への作用に関する研究はほとんど行われていない。そこで、これら薬物が5-HT神経に対して与える作用について検討を行った。Olanzapineの急性処置は、単独でも5-HT遊離を引き起こしたがその量はわずかであった。ところが、SSRIの存在下では単回処置においても顕著な5-HTの遊離を引き起こした。この作用はGABA<sub>A</sub>受容体阻害薬の存在下で減弱したことから、抑制性のGABA神経の抑制、すなわち脱抑制が、その背景にあることが示唆される。また、benzodiazepineはolanzapineによる5-HTの遊離のみならず、SSRI持続処置により引き起こされた5-HT遊離増強をも、単回の共処置で有意に抑制したことから、benzodiazepineがこれら抗うつ薬の5-HT遊離作用に対して拮抗的に作用することが示唆される。

以上、申請者は、縫線核脳切片培養系を用いた5-HT神経活動の評価系を確立し、依存性薬物MDMA、臨床上用いられる抗うつ薬および近年使用が拡大している抗精神薬と抗うつ薬の併用が5-HT神経機能を上昇させ、それらの背景に開口放出を介した5-HTの遊離上昇があることを明らかにした。本研究成果は、依存性薬物および抗うつ薬の作用機構において、グルタミン酸やノルアドレナリン、GABAといった様々な神経系と5-HT神経との相互作用が重要な役割を果たすことを示唆するとともに、縫線核脳切片培養系の、5-HT神経機能評価系としての有用性を示唆するものである。これらの知見は、依存性薬物および抗うつ薬の作用機構の解明と、新規抗うつ薬の創製に有用な基礎的知見を提供するものである。

よって本論文は博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認める。

さらに平成25年2月25日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。