

博士論文

神経突起伸展に対する抗うつ薬の作用と  
**sigma-1** 受容体の関与

令和2年3月

松嶋 ゆかり

安田女子大学大学院  
薬学研究科博士課程

## 目次

序論	1
第1章 NGF 誘発神経突起伸展に対する SSRIs の作用	
緒言	5
実験材料ならびに実験方法	7
実験成績	10
考察	18
第2章 NGF 誘発神経突起伸展に対する SSRIs の作用と sigma-1 受容体の関連	
緒言	21
実験材料ならびに実験方法	23
実験成績	25
考察	30
第3章 デキサメタゾンによる NGF 誘発神経突起伸展および Akt リン酸化 抑制作用に対するフルボキサミンの効果と sigma-1 受容体との関連	
緒言	34
実験材料ならびに実験方法	36
実験成績	39
考察	53
総括	56
参考文献	60
学会発表	69
発表論文	70
謝辞	71

## 序論

うつ病は、抑うつ気分、意欲低下、思考・行動の抑止を主症状とし、不眠、体のだるさ、食欲低下などの身体的症状を伴い、自殺企図の危険性がある精神疾患である。これらの症状が2週間以上続く状態を「うつ病」と、米国精神医学会による診断基準である *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition (DSM-V)* に従って診断する[1]。我が国では若い世代の自殺が深刻な状況にあり、15～39歳の各年代の死因の第1位は自殺となっている。内閣府が発表している「平成29年年齢階級別原因・動機別自殺者数」によると、自殺者の約半数が健康問題を原因としており、また健康問題の中でも、うつ病を原因とする自殺者は39%にもおよんでいる[2]。したがって、我が国の自殺防止対策はうつ病の対策が核となっており、重要な課題である。しかし、うつ病の発症および治療メカニズムの全貌は未だ明らかになっておらず、全体像の解明が強く望まれている。

近年、うつ病は遺伝的素因と身体的および心理的ストレスなど様々な病態生理学的メカニズムを介して発症し、多因子性の病因を有することが示唆されている。うつ病の病態生理学的メカニズムとして、ノルアドレナリン作動性およびセロトニン作動性神経伝達の活動低下、神経栄養因子 (Neurotrophins) の減少、視床下部-下垂体-副腎系 (Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis; HPA系) および炎症反応系の機能亢進などの関与が明らかとなっている[3]。抗うつ薬は、モノアミンを神経終末から放出させ、枯渇させるレセルピンによりうつ症状が発現すること[4]、抗うつ効果を示す薬物がモノアミン再取り込み阻害作用を有すること[5,6]から偶然発見された。これらの知見により、脳内モノアミンが欠乏し、うつ症状が発現するというモノアミン仮説が提唱された。

選択的セロトニン再取り込み阻害薬 (Selective Serotonin Reuptake Inhibitors; SSRIs) はモノアミン仮説に基づき開発された抗うつ薬である。現在では、有効

性及び安全性の観点からうつ病治療の第一選択薬として広く使用されている [7,8]。日本では 1999 年にフルボキサミンが最初に承認されたことを皮切りに、パロキセチン、セルトラリンおよびエスシタロプラムの 4 薬物が承認され、臨床で使用されている。SSRIs は脳内セロトニン神経のセロトニントランスポーターを選択的に阻害し、シナプス間隙におけるセロトニンの濃度を上昇させ、脳内セロトニン神経の神経伝達を促進することから抗うつ作用を発揮していると考えられている [9-11]。しかし、実験動物およびヒトの血中セロトニン濃度は投与後速やかに上昇するにもかかわらず、ヒトでの抗うつ効果の発現には少なくとも数週間はかかるという時間的な隔りがあることから、SSRIs の抗うつ効果はただ単にセロトニン濃度の増加だけによるものではない可能性が考えられている [12,13]。

一方、近年うつ病の発症および治療メカニズムにおいて sigma-1 受容体の関与が示唆され、うつ病治療薬の新たなターゲットとして sigma-1 受容体が注目されている。Sigma 受容体は、1976年に Martinらにより発見され、sigma-1 および sigma-2 の 2 つのサブタイプに分類されている [14]。Sigma-1 受容体は全身に存在するが、特に中枢神経系においては、海馬、扁桃体などを含む大脳辺縁系および大脳皮質に多く発現している [15]。また、sigma-1 受容体は細胞膜および細胞内の小胞体膜上に存在し、IP<sub>3</sub> 受容体 (Inositol trisphosphate receptor) の分子シャペロンとして機能しており、sigma-1 受容体の活性化が神経保護作用の発現、神経の可塑性および神経分化に関与することが報告されている [16]。また、SSRIs であるフルボキサミン、セルトラリンおよび三環系抗うつ薬であるイミプラミン、アミトリプチリンが、sigma-1 受容体に高親和性を示すこと [17,18]、sigma-1 受容体ノックアウトマウスがうつ病様行動を示すこと [19] および sigma-1 受容体アゴニストである SA4053 および UMB23 が、抗うつ薬の薬効評価に使用されている強制水泳試験や尾懸垂試験において、効果を示すことが見出だされている [20-22]。さらに、sigma-1 受容体アゴニストが神経新生を増強することも報告されて

おり、この事実はsigma-1受容体が抗うつ薬の作用に関与している可能性を強く支持している[23–25]。これらの知見から、sigma-1受容体は、うつ病治療において重要な役割を果たしていることが推測されるが、詳細は明らかではない。

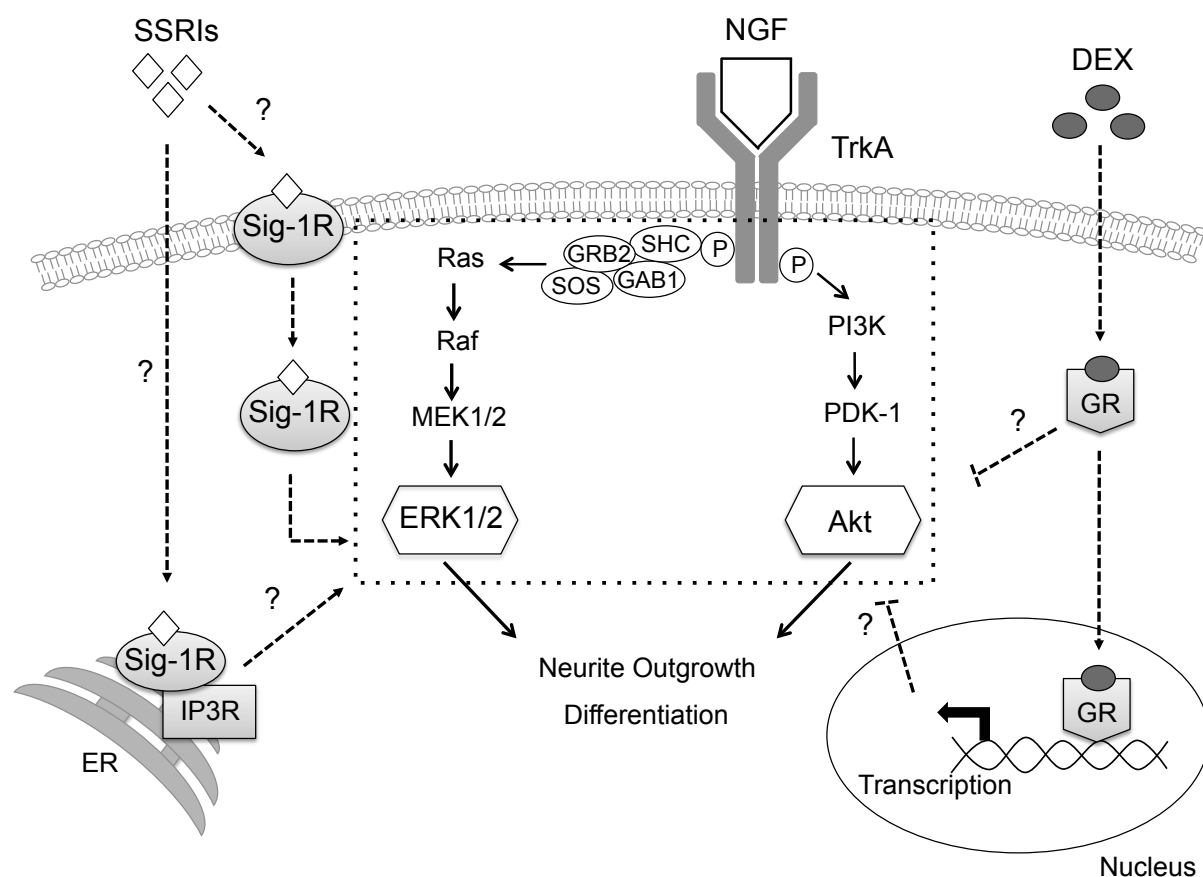
うつ病の発症機序の仮説の一つに、神経内分泌仮説がある。すなわち、うつ病において、HPA系の機能亢進が認められ、その主な原因はコルチコトロピン放出ホルモンの過剰分泌であると考えられている。また、うつ病患者において副腎皮質ステロイドであるコルチゾールの血中濃度の増加、死後脳海馬や扁桃体でグルココルチコイド受容体の mRNA の発現低下が確認されており、HPA系の過活動および HPA系のネガティブフィードバック機構の障害がうつ病患者の大半に見られることが報告されている[26]。

デキサメタゾンとは合成副腎皮質ステロイド薬であり、皮膚炎、自己免疫疾患およびアレルギー疾患の治療に広く用いられている。しかしながら、デキサメタゾンをはじめとする副腎皮質ステロイド薬は、長期投与により副作用としてうつ症状を高い確率で発現することが問題となっている。このように、うつ病と HPA系の機能亢進には密接な関係がある。したがって、現在ではうつ病の生化学的診断法としてデキサメタゾン抑制試験およびデキサメタゾン/コルチコトロピン放出ホルモン負荷試験が用いられている。

近年、Teradaらは、デキサメタゾンの前処理によって PC12 細胞における神経成長因子 (Nerve Growth Factor; NGF) 誘発神経突起伸展が抑制されることを見出した[27]。ステロイドによる神経突起伸展の抑制作用は、*in vitro* におけるうつ病の病態モデルとして有用であり、このモデルに対する抗うつ薬の効果を検討することにより、抗うつ薬の効果ならびにそれらの特徴を見出すことが可能であると考えられる。

本研究は、第 1 章では代表的な抗うつ薬である SSRI の神経突起伸展に対する作用を明らかにする目的で、神経分化の研究に広く使用されている神経様細胞である PC12 細胞と NGF による神経突起伸展モデルを用いて、NGF 誘発神経

突起伸展に対する SSRIs の作用を検討した。第 2 章では、NGF 誘発神経突起伸展に対するフルボキサミンおよびセルトラリンの効果と sigma-1 受容体との関連について検討した。第 3 章では、NGF 誘発神経突起伸展に関連する細胞内シグナル経路の下流に位置するプロテインキナーゼ B (Akt) および細胞外調節キナーゼ 1/2 (extracellular regulated kinase 1/2; ERK1/2) のリン酸化に対するフルボキサミンの作用を検討した。また、デキサメタゾン前処理による NGF 誘発神経突起伸展抑制作用に対するフルボキサミンの効果と sigma-1 受容体との関連について検討し、抗うつ薬の sigma-1 受容体を介した作用機序の解明を試みた。



**Fig. 1 The signaling pathways down-stream of NGF and its receptor TrkA and their interactions with sigma-1 receptor.**

## 第 1 章 NGF 誘発神経突起伸展に対する SSRI の作用

### 〔緒言〕

うつ病の発症は、これまで脳内のモノアミンの機能的障害が原因と考えられてきた。しかし、うつ病患者の脳において大脳辺縁系を中心に構造および機能に異常が生じていることが報告され[28]、うつ病の発症には脳内の器質的障害も関連することが示唆されている。さらに、うつ病患者における脳由来神経栄養因子 (Brain-Derived Neurotrophic Factor; BDNF) の血清濃度の減少[29]、抗うつ薬の投与により血清 BDNF 濃度が増加することが報告されている[30]。以上の知見から、神経栄養因子が、うつ病の発症および治療に重要な役割を担っている可能性が推測されている。

NGF および BDNF などの神経栄養因子は、様々なタイプの神経の生存および分化に重要な役割を果たすタンパク質ファミリーである[31-33]。また、神経栄養因子およびこれらの受容体は、成人脳で発現し、神経新生に関与することが報告されている[34-36]。NGF は、約 120 個のアミノ酸残基からなるポリペプチド鎖が非共有結合したホモ 2 量体であり[37,38]、標的細胞表面の Tropomyosin receptor kinase A (TrkA) 高親和性受容体および p75 低親和性受容体 (Low-affinity nerve growth factor receptor) に結合することにより細胞を活性化する[39]。また、NGF は神経の発達、機能制御および神経細胞死の防御機構において重要な役割を担っている分子である[40,41]。

PC12 細胞は、1976 年に Greene らによりラットの副腎髄質からクロム親和性の細胞として単離された[42]。PC12 細胞は NGF の添加により、神経突起を伸展させ神経様細胞に分化する特徴を有することから、神経分化のモデルとして広く使用されている[43,44]。

そこで本章では, PC12 細胞と NGF による神経突起伸展モデルを用いて, うつ病治療において第一選択薬として使用されている SSRI の作用を検討した。



## [実験材料ならびに実験方法]

### 1. 細胞培養

実験にはラット副腎髄質褐色細胞腫由来細胞 (PC12 細胞) を用いた。Dulbecco's modified Eagle's medium/nutrient mixture F-12 (DMEM/F-12; Gibco-Life Technologies, Gaithersburg, MD, U.S.A) に 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS; Gibco-Life Technologies), 1% (v/v) ペニシリン/ストレプトマイシン (ナカライテスク, 京都) を加えたものを培養液とし, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 存在下で培養した。

### 2. 使用薬物

使用薬物は, NGF (murine NGF 2.5S derived from mouse submaxillary glands, Alomone Labs, Ltd, Jerusalem, Israel), フルボキサミン塩酸塩 (フルボキサミン; 東京化成, 東京), セルトラリン塩酸塩 (セルトラリン; 東京化成, 東京), およびパロキセチン塩酸塩 (パロキセチン; 東京化成, 東京) である。

使用薬物の化学構造は Fig.2 に示した (塩類は省略した)。

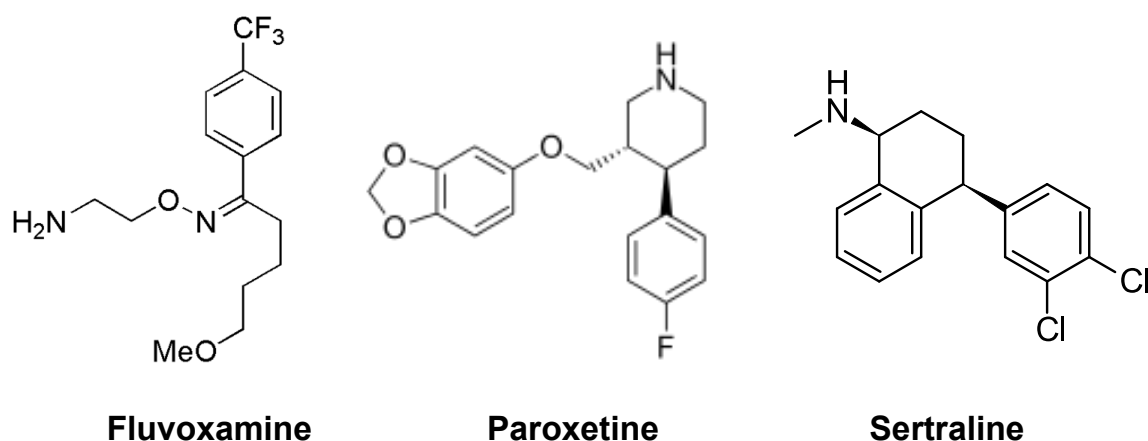


Fig. 2 Chemical structures of drugs used in this chapter

### 3. 実験方法

#### 3-1. 神経突起の測定

PC12 細胞を type I collagen-coated 60-mm tissue culture dishes (イワキ, 東京) に  $1.0 \times 10^5$  細胞個播種し, 24 時間培養した。その後, DMEM/F-12 に 5% FBS, 1% ペニシリン/ストレプトマイシンを加えたものを培養液とし, 培養液に NGF (50 ng/mL) および各薬物を添加しさらに 24 時間培養した。培養 24 時間後にデジタルカメラ (Digital Sight DS-L2 system, ニコン, 東京) を搭載した倒立顕微鏡 (ECLIPSE TS100, ニコン, 東京) を用いて撮影した。各ディッシュごとに 10-15 個の細胞を含む無作為に選んだ 5 視野の画像を得た。画像の解析には ImageJ 1.48v Software (freely available from the National Institutes of Health, Bethesda, MD, U.S.A) を用いて, 各画像 10 個の細胞の神経突起の全長を測定した。各条件の 5 視野の結果を平均した平均神経突起長を Neurite length ( $\mu\text{m}$ ) として評価した。

#### 3-2. 細胞生存試験

細胞生存率は [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide assay (MTT assay; ナカライテスク, 京都) および CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (プロメガ, 東京) を用いて行なった。PC12 細胞を 96 ウェルプレートに  $1.0 \times 10^4$  cells/mL の密度で播種し, 24 時間培養した。各薬物を添加してさらに 24 時間培養した。その後, MTT assay では, MTT 試薬 (20  $\mu\text{L}/\text{well}$ ) を添加し, 4 時間インキュベーションした後, 培地を吸い取り DMSO (150  $\mu\text{L}/\text{well}$ ) を添加し 30 分間振とうし, 細胞および生成した結晶を溶解した後, プレートリダーを用いて吸光度を測定した。CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay では, 96 ウェルプレートを 30 分間室温で静置し室温で平衡化させた後, CellTiter-Glo® 試薬 (100  $\mu\text{L}/\text{well}$ ) を添加し 2 分間混合および 10 分間室温で静置

した後、プレートリーダーを用いて発光を測定した。各結果は対照群のウェルの値に対する百分率で表した。

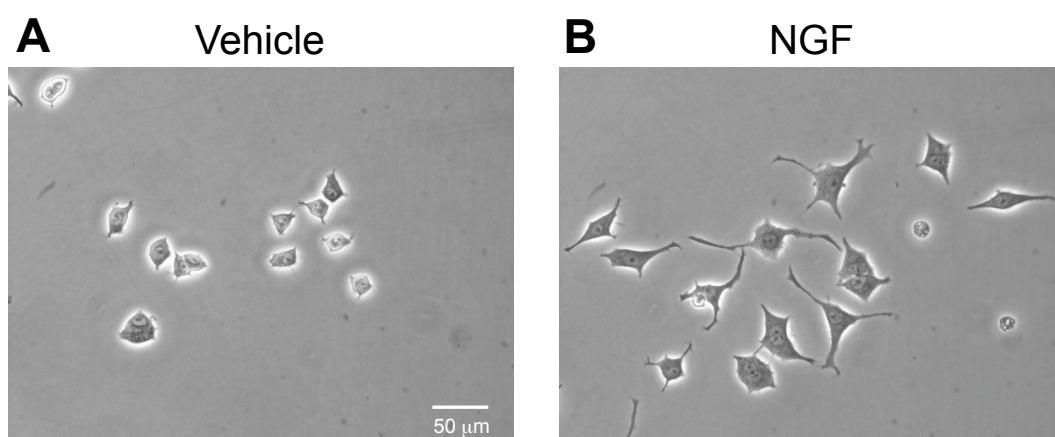
### 3-3. 統計処理

実験成績はすべて平均値 ± 標準偏差で示した。統計学的有意差は、一元配置分散分析 (ANOVA) および Dunnett 法または Tukey 法を用いて検定した。また、50%阻害濃度 (Half-maximal inhibitory concentration; IC<sub>50</sub>) は、probit 法により算出した。

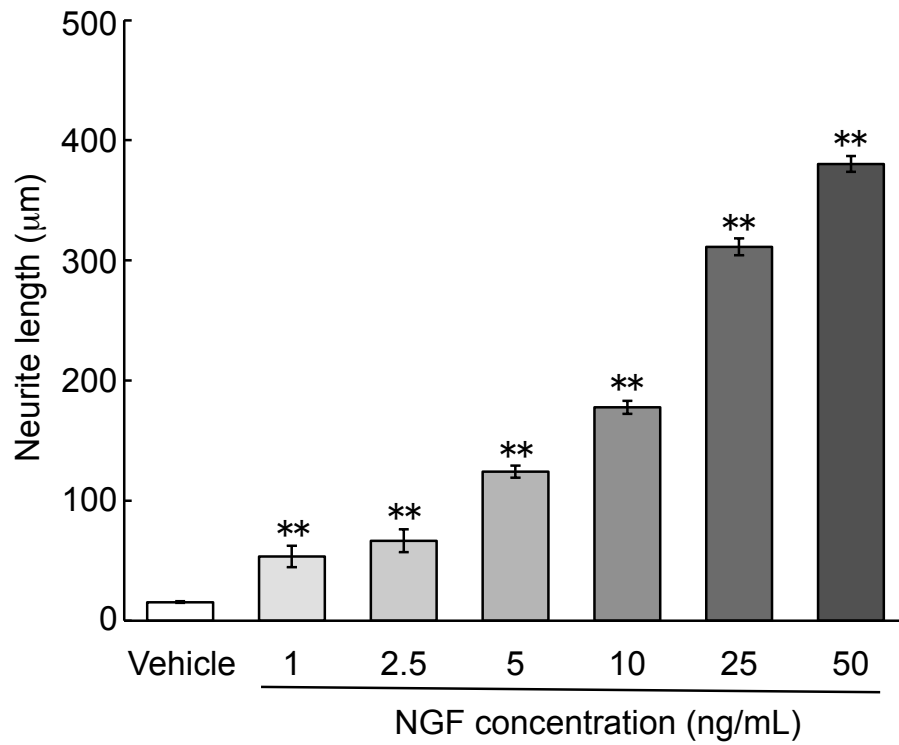
## 〔実験成績〕

### 1. PC12 細胞における神経突起伸展に対する NGF の作用

PC12 細胞における神経突起伸展に対する NGF (1, 2.5, 5, 10, 25, and 50 ng/mL) の作用を検討した。Fig. 3 は倒立顕微鏡で撮影した代表的な画像を示した。PC12 細胞は NGF (1-50 ng/mL) の添加により、濃度依存的に有意な神経突起伸展作用を示した (Fig. 4)。



**Fig. 3 Morphological changes by NGF-induced neurite outgrowth in PC12 cells.** Representative image of phase-contrast photomicrographs. PC12 cells were treated with NGF (50 ng/mL). After 24 h, photomicrographs were taken by inverted phase-contrast microscopes. (A) Vehicle, (B) NGF (50 ng/mL). Scale bar = 50  $\mu\text{m}$ .



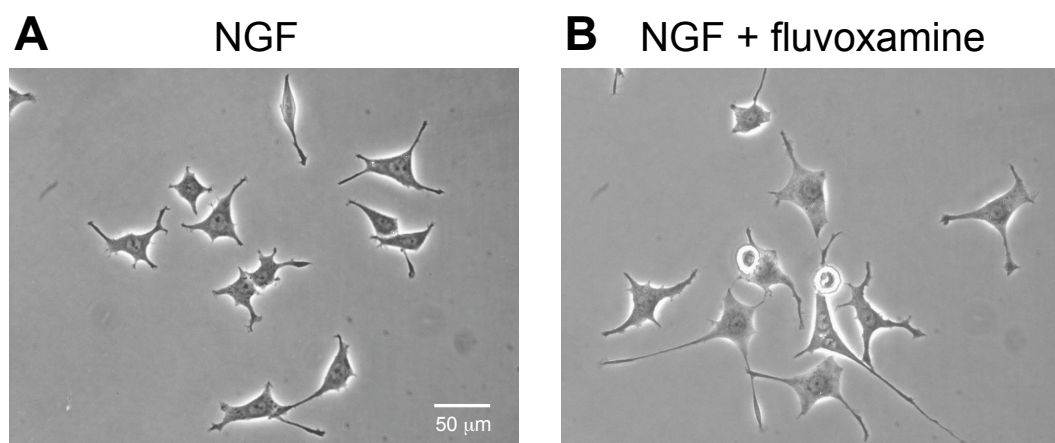
**Fig. 4 NGF-induced neurite outgrowth in PC12 cells.**

PC12 cells were treated with NGF (1, 2.5, 5, 10, 25, and 50 ng/mL) for 24 h. The values represent the mean  $\pm$  S.E.M. (n = 9). \*\* Significantly different from vehicle at  $p < 0.01$ .

## 2. NGF 誘発神経突起伸展に対する SSRI の作用

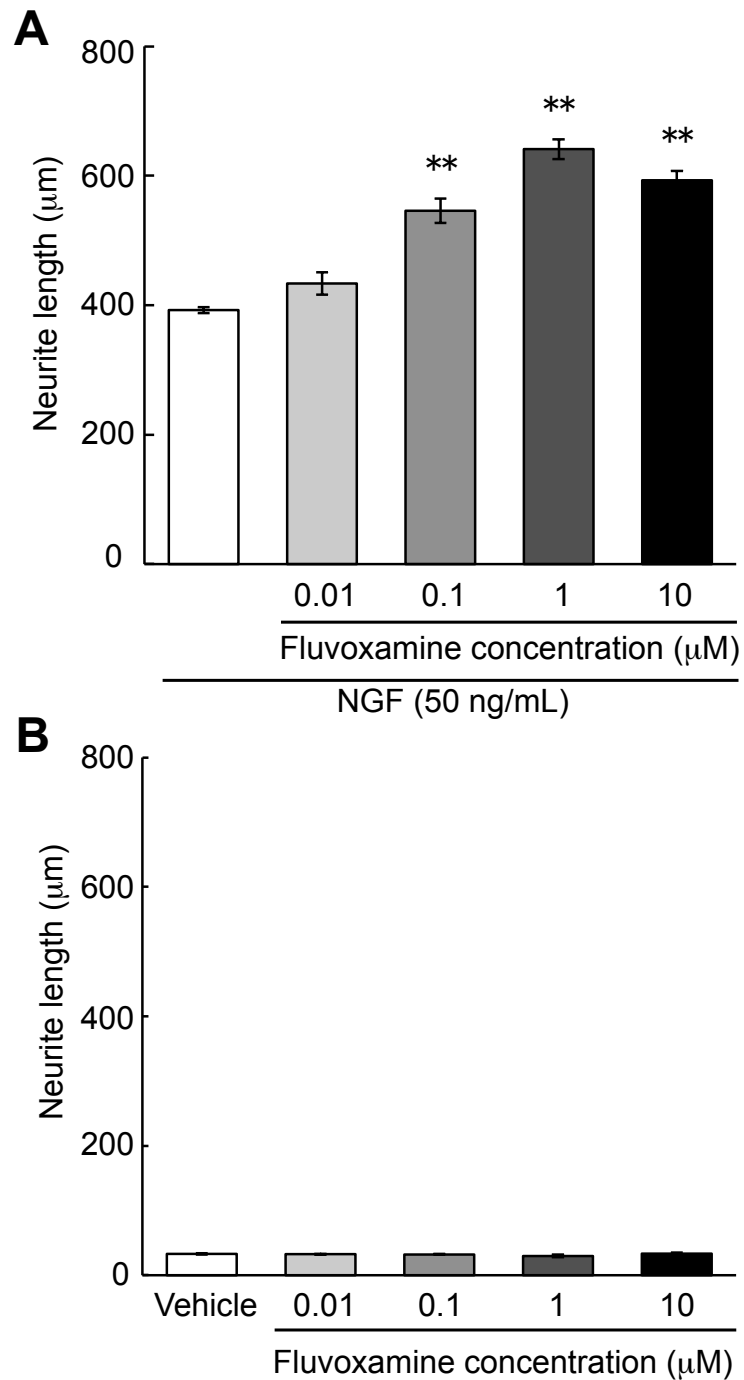
### 2-1. NGF 誘発神経突起伸展に対するフルボキサミンの作用

PC12 細胞に NGF (50 ng/mL) 存在下または非存在下において、フルボキサミン (0.01, 0.1, 1, and 10  $\mu$ M) を添加し、24 時間培養した。Fig. 5 に代表例を示した。フルボキサミンは、PC12 細胞における NGF 誘発神経突起伸展に対して濃度依存的な増強効果を示した (Fig. 6A)。有意な効果は、0.1, 1 および 10  $\mu$ M で観察された。NGF 非存在下では、フルボキサミンは PC12 細胞における神経突起伸展に対して 10  $\mu$ M の濃度でも有意な影響を与えなかった (Fig. 6B)。



**Fig. 5 Morphological changes by fluvoxamine on NGF-induced neurite outgrowth in PC12 cells.**

Representative images of the effect of fluvoxamine on NGF-induced neurite outgrowth. PC12 cells were treated with NGF (50 ng/mL) or NGF plus fluvoxamine (1  $\mu$ M). After 24 h, photomicrographs were taken by inverted phase-contrast microscopes. (A) NGF (50 ng/mL), (B) NGF + fluvoxamine (1  $\mu$ M). Scale bar = 50  $\mu$ m.

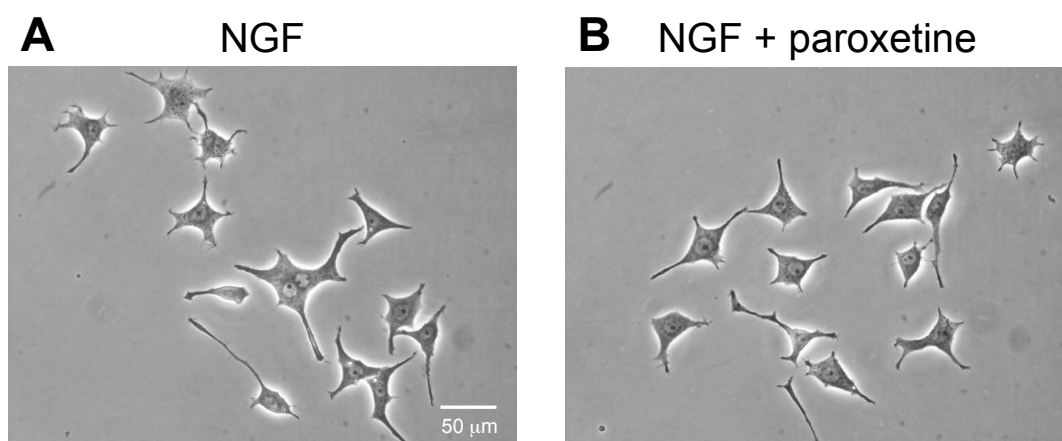


**Fig. 6 Effect of fluvoxamine on NGF-induced neurite outgrowth in PC12 cells.**

(A) Neurite length of PC12 cells were treated with NGF (50 ng/mL) and fluvoxamine (0.01, 0.1, 1, and 10  $\mu\text{M}$ ). (B) PC12 cells were treated with fluvoxamine (0.01, 0.1, 1, and 10  $\mu\text{M}$ ). The values represent the mean  $\pm$  S.E.M. (n = 9). \*\* Significantly different from NGF-treated group at  $p < 0.01$ .

## 2-2. NGF 誘発神経突起伸展に対するパロキセチンの作用

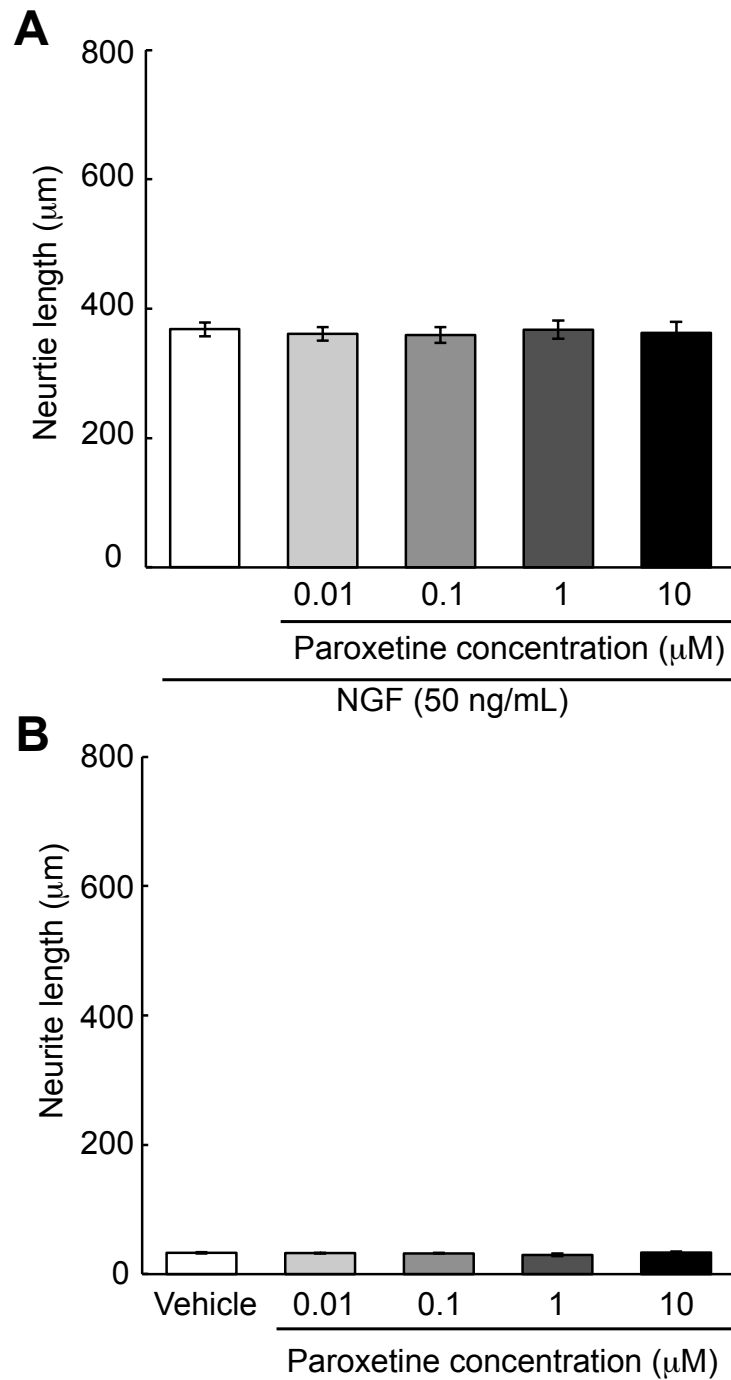
PC12 細胞に NGF (50 ng/mL) 存在下または非存在下において、パロキセチン (0.01, 0.1, 1, and 10  $\mu$ M) を添加し、24 時間培養した。Fig. 7 に代表例を示した。パロキセチンは、PC12 細胞における NGF 誘発神経突起伸展に対して 10  $\mu$ M の濃度でも有意な影響を与えなかった (Fig. 8A)。また、NGF 非存在下においても、パロキセチンは PC12 細胞における神経突起伸展に対して有意な影響を与えなかった (Fig. 8B)。



**Fig. 7 Morphological changes by paroxetine on NGF-induced neurite outgrowth in PC12 cells.**

Representative images of the effect of paroxetine on NGF-induced neurite outgrowth. PC12 cells were treated with NGF (50 ng/mL) or NGF plus paroxetine (1  $\mu$ M). After 24 h, photomicrographs were taken by inverted phase-contrast microscopes. (A) NGF (50 ng/mL), (B) NGF + paroxetine (1  $\mu$ M). Scale bar = 50  $\mu$ m.



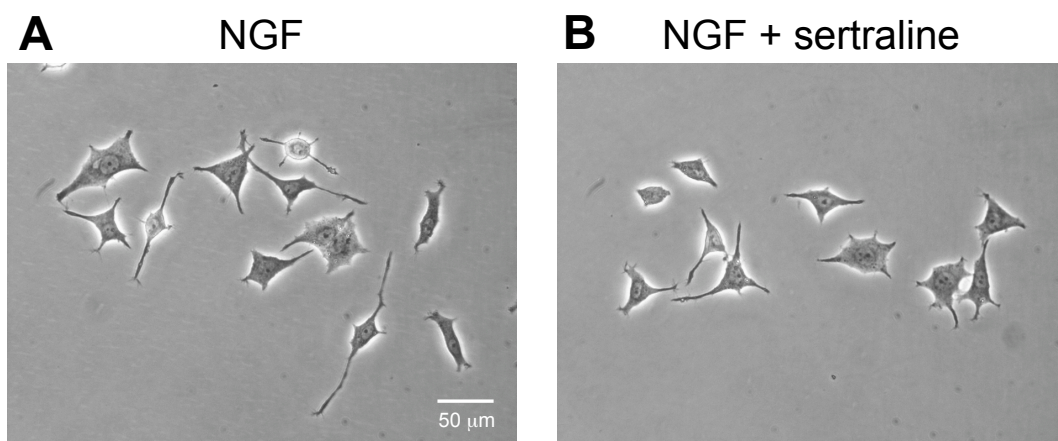


**Fig. 8 Effect of paroxetine on NGF-induced neurite outgrowth in PC12 cells.**

(A) Neurite length of PC12 cells were treated with NGF (50 ng/mL) and paroxetine (0.01, 0.1, 1, and 10 µM). (B) PC12 cells were treated with paroxetine (0.01, 0.1, 1, and 10 µM). The values represent the mean ± S.E.M. (n = 9).

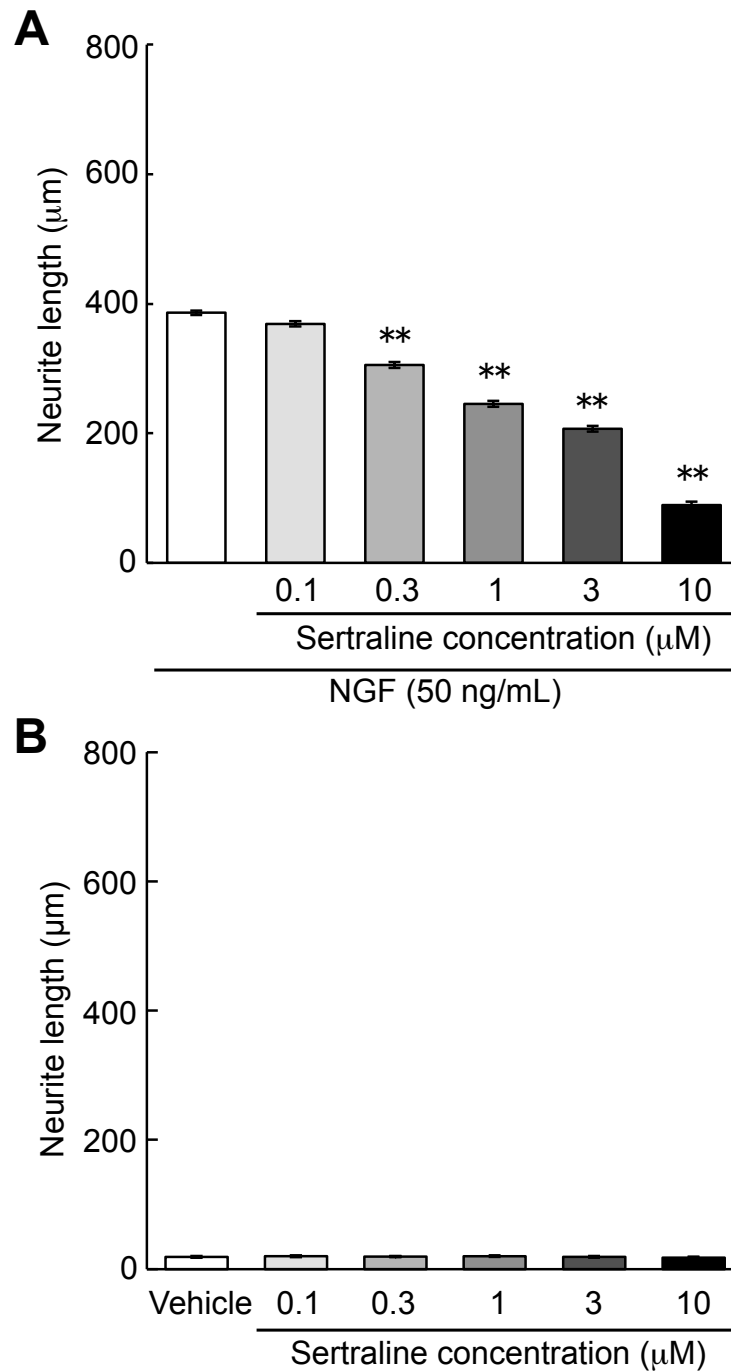
### 2-3. NGF 誘発神経突起伸展に対するセルトラリンの作用

PC12 細胞に NGF (50 ng/mL) 存在下または非存在下において、セルトラリン (0.1, 0.3, 1, 3, and 10  $\mu\text{M}$ ) を添加し、24 時間培養した。Fig. 9 に代表例を示した。セルトラリンは、PC12 細胞における NGF 誘発神経突起伸展に対して濃度依存的な抑制効果を示した (Fig. 10A)。有意な効果は 0.3, 1, 3 および 10  $\mu\text{M}$  で観察された。NGF 非存在下では、セルトラリンは PC12 細胞における神経突起伸展に対して 10  $\mu\text{M}$  の濃度でも有意な影響を与えなかった (Fig. 10B)。



**Fig. 9 Morphological changes by sertraline on NGF-induced neurite outgrowth in PC12 cells.**

Representative images of the effect of sertraline on NGF-induced neurite outgrowth. PC12 cells were treated with NGF (50 ng/mL) or NGF plus sertraline (1  $\mu\text{M}$ ). After 24 h, photomicrographs were taken by inverted phase-contrast microscopes. (A) NGF (50 ng/mL), (B) NGF + sertraline (1  $\mu\text{M}$ ). Scale bar = 50  $\mu\text{m}$ .

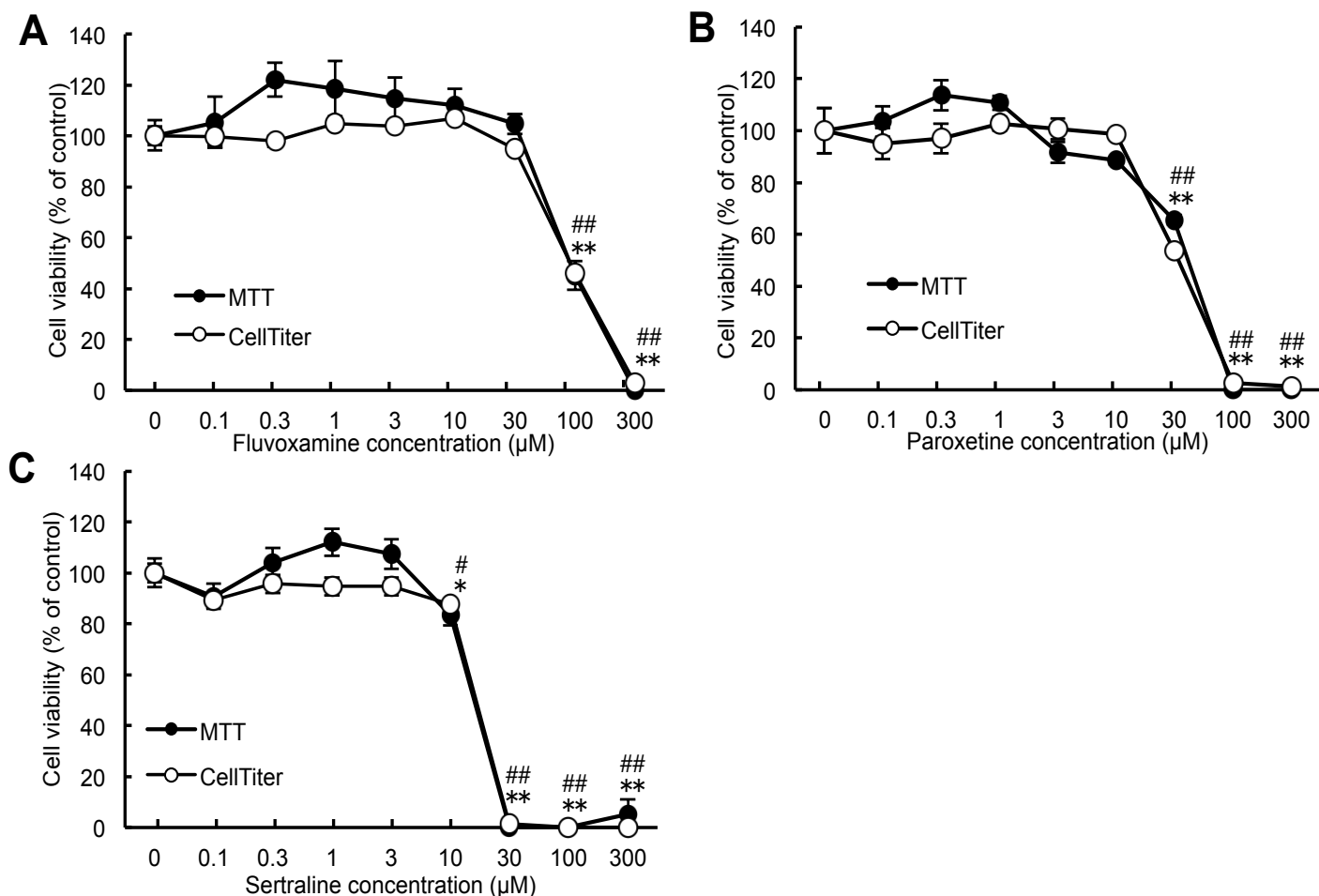


**Fig. 10 Effect of sertraline on NGF-induced neurite outgrowth in PC12 cells.**

(A) PC12 cells were treated with NGF (50 ng/mL) and sertraline (0.1, 0.3, 1, 3, and 10  $\mu\text{M}$ ). (B) PC12 cells were treated with sertraline (0.1, 0.3, 1, 3, and 10  $\mu\text{M}$ ). The values represent the mean  $\pm$  S.E.M. (n = 9). \*\* Significantly different from NGF-treated group at  $p < 0.01$ .

### 3. PC12 細胞の細胞生存率に対する SSRI の作用

PC12 細胞にフルボキサミン、パロキセチンおよびセルトラリンをそれぞれ添加し 24 時間培養し、MTT 試薬および CellTiter-Glo® 試薬を用いて細胞生存率を測定した。フルボキサミンは 100  $\mu\text{M}$  以上で PC12 細胞の細胞生存率を有意に低下させた (Fig. 11A)。パロキセチンは 30  $\mu\text{M}$  以上で PC12 細胞の細胞生存率を有意に低下させた (Fig. 11B)。セルトラリンは 10  $\mu\text{M}$  以上で PC12 細胞の細胞生存率を有意に低下させた (Fig. 11C)。細胞生存率の  $\text{IC}_{50}$  値を算出したところ、フルボキサミンは  $210 \pm 16 \mu\text{M}$  (MTT assay),  $87 \pm 4.3 \mu\text{M}$  (CellTiter assay), パロキセチンは  $53 \pm 2.1 \mu\text{M}$  (MTT assay),  $32 \pm 1.4 \mu\text{M}$  (CellTiter assay), セルトラリンは  $10 \pm 1.3 \mu\text{M}$  (MTT assay),  $8.9 \pm 1.8 \mu\text{M}$  (CellTiter assay) であった。



**Fig. 11 Effects of SSRIs on PC12 cells viability.**

Cell viability was expressed as a percentage of control. (A) Fluvoxamine (B) Paroxetine (C) Sertraline. The values represent means  $\pm$  S.E.M. (n = 9). \* Significantly different from control group at  $p < 0.05$ . \*\* Significantly different from control group at  $p < 0.01$  (MTT assay). # Significantly different from control group at  $p < 0.05$ . ## Significantly different from control group at  $p < 0.01$  (CellTiter-Glo assay).

## 〔考察〕

本実験において、フルボキサミンは 0.1, 1 および 10  $\mu\text{M}$  の濃度で PC12 細胞における NGF (50 ng/mL) 誘発神経突起伸展作用を有意に増強させた。さらに、フルボキサミンがそれ自体で神経成長因子様作用を有するか否かを調べる目的で NGF 非存在下における検討を行なった。その結果、フルボキサミンは、NGF 非存在下では PC12 細胞における神経突起伸展に有意な影響を与えなかった。これらの成績から、フルボキサミンは NGF 様アゴニストとして作用するのではなく、NGF によって誘発される神経突起伸展作用を増強することが判明した。

次に、パロキセチンの影響を検討した結果、パロキセチンは NGF 誘発神経突起伸展作用に対して 10  $\mu\text{M}$  の濃度においても有意な影響を与えなかった。NGF 非存在下においても PC12 細胞における神経突起伸展に有意な影響を与えなかった。また、セルトラリンは 0.3, 1, 3 および 10  $\mu\text{M}$  の濃度で NGF 誘発神経突起伸展作用を有意に抑制した。NGF 非存在下においては、PC12 細胞における神経突起伸展に有意な影響を与えなかった。

Ishima らは、フルボキサミンが 1 および 10  $\mu\text{M}$  で NGF (2.5 ng/mL) 誘発神経突起伸展作用を増強させることを報告しており [45]、本実験での成績と同様である。一方、Nishimura らはセルトラリンは 1  $\mu\text{M}$  においては NGF 誘発神経突起伸展作用に対して抑制効果を示さないが、10  $\mu\text{M}$  で抑制効果を示したと報告している [46]。本研究での成績は、セルトラリンは 1  $\mu\text{M}$  の濃度においても抑制効果を示した。この相違点は、実験方法の違い (NGF 濃度; 50 ng/mL vs 2.5 ng/mL, 培養期間; 24 時間 vs 5 日間) に起因すると考えられる。

SSRIs はいくつかの細胞種で細胞毒性を示すことが明らかとなっている。例えば、セルトラリンは HepG2 ヒト肝癌細胞 (HepG2 human hepatocellular carcinoma cell : HepG2 細胞) に対し、カスパーゼ経路の活性化を介した細胞生

存率の低下を示し抗癌作用を有すること[47], ヒト結腸直腸癌細胞株 (human colorectal carcinoma cell line : HT29 細胞) に対し, 細胞生存率および細胞増殖の用量依存的な阻害を誘導すること[48]などが報告されている。また, Kuwahara らにより HepG2 細胞における細胞生存率に対するセルトラリンの IC<sub>50</sub> 値は 1.24 ± 0.055 μM であることが示されている。フルボキサミンの IC<sub>50</sub> 値は 31.0 ± 3.33 μM であり, セルトラリンに比べて約 25 倍小さいことが報告されている[49]。したがって, セルトラリンによる NGF 誘発神経突起伸展抑制作用は, PC12 細胞に対する細胞毒性作用により惹起された可能性が考えられた。そこで, PC12 細胞の細胞生存率に対する SSRIs の影響を検討した。その結果, Fig.11 に示したように, フルボキサミンは 30 μM 以上, パロキセチンは 10 μM 以上, セルトラリンは 10 μM 以上で細胞生存率を有意に減少させた。細胞生存率の IC<sub>50</sub> 値を算出したところ, フルボキサミンは 210 ± 16 μM (MTT assay), 87 ± 4.3 μM (CellTiter assay), パロキセチンは 53 ± 2.1 μM (MTT assay), 32 ± 1.4 μM (CellTiter assay), セルトラリンは 10 ± 1.3 μM (MTT assay), 8.9 ± 1.8 μM (CellTiter assay) であることが判明した。以上の成績から, セルトラリンは他の SSRIs に比べて低濃度において細胞毒性を有することが明らかとなった。また, Table 1 に示したように, NGF 神経突起伸展増強作用が認められたフルボキサミンの濃度では, 細胞生存率に影響がないことが判明した。さらに, セルトラリンは PC12 細胞に対して細胞生存率に影響を与えない低濃度においても, NGF 誘発神経突起伸展を抑制することが判明した。したがって, 低濃度におけるセルトラリンの NGF 誘発神経突起伸展抑制作用は, PC12 細胞に対する細胞毒性によるものではないことが確認された。本研究の成績から, フルボキサミンは, NGF 誘発神経突起伸展に対して増強作用を示し, セルトラリンは逆に抑制作用を示すことが判明した。したがって, NGF 誘発神経突起伸展に対する作用は, SSRIs の本来の作用機序として考えられているセロトニン再取り込み阻害作用によるものではないことが明らかとなった。

**Table 1 Effects of SSRIs on NGF-induced neurite outgrowth and cell viability in PC12 cells**

Concentration ( $\mu\text{M}$ )		Neurite outgrowth	Cell viability
Fluvoxamine	0.01	—	—
	0.1	↑	—
	1	↑	—
	10	↑	—
Paroxetine	0.01	—	—
	0.1	—	—
	1	—	—
	10	—	—
Sertraline	0.01	—	—
	0.1	↓	—
	0.3	↓	—
	1	↓	—
	3	↓	—
	10	↓	↓

↑ : increase, ↓ : decrease, — : no effect.



## 第 2 章 NGF 誘発神経突起伸展に対する SSRIs の作用と sigma-1 受容体の関連

### 〔緒言〕

Sigma 受容体は、発見初期にはオピオイド受容体のサブタイプとして分類されていた。しかし、その後の研究により、sigma 受容体は、リガンドである SKF-10047 の作用がオピオイド受容体拮抗薬であるナルトレキソンにより拮抗されないことが明らかになり [50]、現在では独自の受容体として分類されている。Sigma 受容体は sigma-1 および sigma-2 の 2 つのサブタイプが同定されており、sigma-1 受容体は、膜貫通ドメインを有する 223 個のアミノ酸からなる分子量 25,314 Da のタンパク質であり、ヒトを含め様々な哺乳動物種からクローニングされている [51–54]。

近年では、SSRIs をはじめとする抗うつ薬が sigma-1 受容体に対して高親和性を示すことが明らかとなっており、抗うつ薬の作用と sigma-1 受容体との関連が注目されている。SSRIs の中ではフルボキサミンおよびセルトラリンが、sigma-1 受容体に対して高親和性 (フルボキサミン;  $K_i = 36$  nM, セルトラリン;  $K_i = 57$  nM) を有している。一方、同じ SSRIs として頻用されているパロキセチンは、sigma-1 受容体に対する親和性が極めて低い (パロキセチン;  $K_i = 1893$  nM) ことが示されている [17,45]。

第 1 章において、PC12 細胞における NGF 誘発神経突起伸展に対してフルボキサミンは増強作用を示し、セルトラリンは抑制作用、そしてパロキセチンは効果を示さないことが明らかとなった。

そこで本章では、NGF 誘発神経突起伸展作用に対する SSRIs の効果と sigma-1 受容体との関連を明らかにする目的で、まず、NGF 誘発神経突起伸展に対する

sigma-1 受容体アゴニストの影響を検討した。さらに, sigma-1 受容体アンタゴニストを用いて, フルボキサミンによる増強作用およびセルトラリンによる抑制作用に対する sigma-1 受容体の関与を検討した。

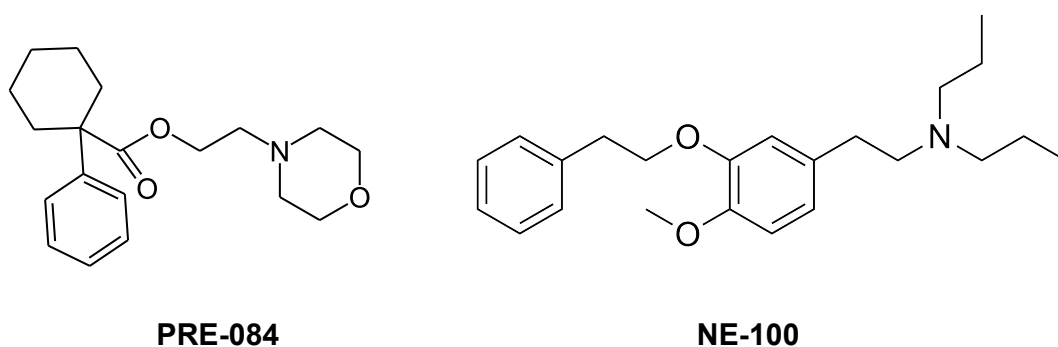
## 〔実験材料ならびに実験方法〕

### 1. 細胞培養

実験には PC12 細胞を用いた。細胞培養は、第 1 章の実験材料ならびに実験方法に述べた方法により行った。

### 2. 使用薬物

使用薬物は、NGF (murine NGF 2.5S derived from mouse submaxillary glands, Alomone Labs, Ltd, Jerusalem, Israel), フルボキサミン塩酸塩 (フルボキサミン; 東京化成, 東京), セルトラリン塩酸塩 (セルトラリン; 東京化成, 東京), PRE-084 塩酸塩 (PRE-084; Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, U.S.A) および NE-100 塩酸塩 (NE-100; Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, U.S.A) である。PRE-084 及び NE-100 の化学構造は Fig. 12 に示した (塩類は省略した)。



**Fig.12 Chemical structures of PRE-084 and NE-100.**

### 3. 実験方法

#### 3-1. 神経突起の測定

神経突起の測定は第 1 章に示した方法で行なった。また、各薬物の作用に対する sigma-1 受容体作用効果の評価は以下の方法で評価した。PC12 細胞を  $1 \times 10^5$  細胞個播種し、24 時間培養した。その後、培養液に NGF (50 ng/mL) および各薬物を添加する 4 時間前に sigma-1 受容体のアンタゴニストである NE-100 (1  $\mu$ M) で前処理した。さらに、培養 24 時間後に第 1 章に示した方法で撮影および解析を行なった。

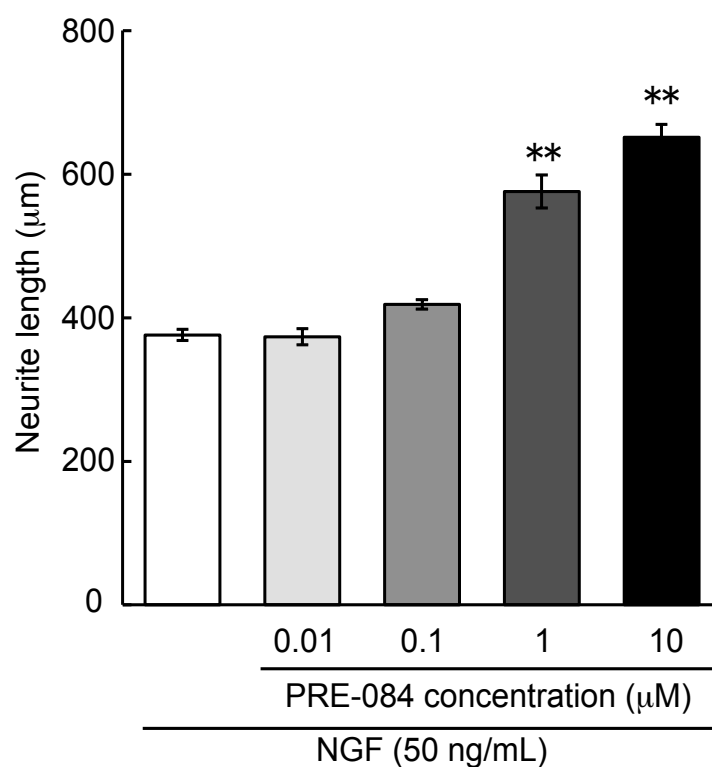
#### 3-2. 統計処理

統計学的有意差は、一元配置分散分析 (ANOVA) および Dunnett 法または Tukey 法を用いて検定した。実験成績はすべて平均値  $\pm$  標準誤差で示した。

## 〔実験成績〕

### 1. NGF 誘神経突起伸展に対する PRE-084 の作用

PC12 細胞に NGF (50 ng/mL) および sigma-1 受容体アゴニストである PRE-084 (0.01, 0.1, 1, and 10  $\mu$ M) を同時添加し, 24 時間培養した。結果は Fig.13 に示したように, PRE-084 は NGF の添加による神経突起伸展作用に対して濃度依存的な増強効果を示し, 1 および 10  $\mu$ M の濃度で有意差が認められた。

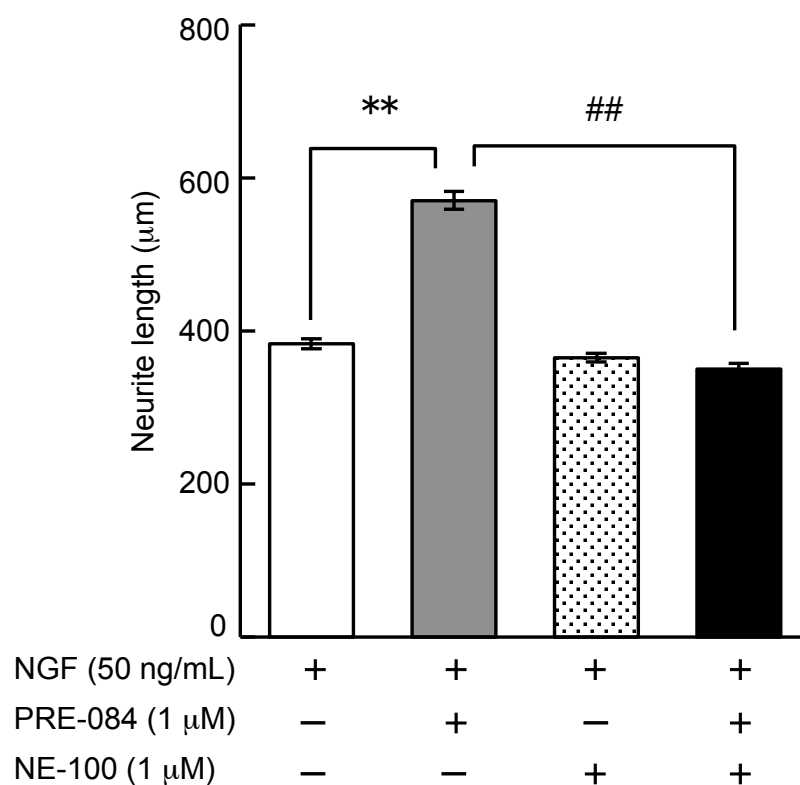


**Fig.13 Effect of PRE-084 on NGF-induced neurite outgrowth in PC12 cells.**

PC12 cells were treated with NGF (50 ng/mL) and PRE-084 (0.01, 0.1, 1, and 10  $\mu$ M) for 24 h. The values represent the mean  $\pm$  S.E.M. (n = 9). \*\* Significantly different from NGF-treated group at  $p < 0.01$ .

## 2. PRE-084 の NGF 誘発神経突起伸展増強作用に対する NE-100 の影響

PC12 細胞に sigma-1 受容体アンタゴニストである NE-100 (1  $\mu$ M) をあらかじめ添加し 4 時間培養させた後、NGF 存在下において PRE-084 (1  $\mu$ M) および NE-100 を同時添加し、さらに 24 時間培養した。結果は Fig. 14 に示したように、PRE-084 による NGF 誘発神経突起伸展増強作用は、NE-100 の併用によって有意に拮抗された。



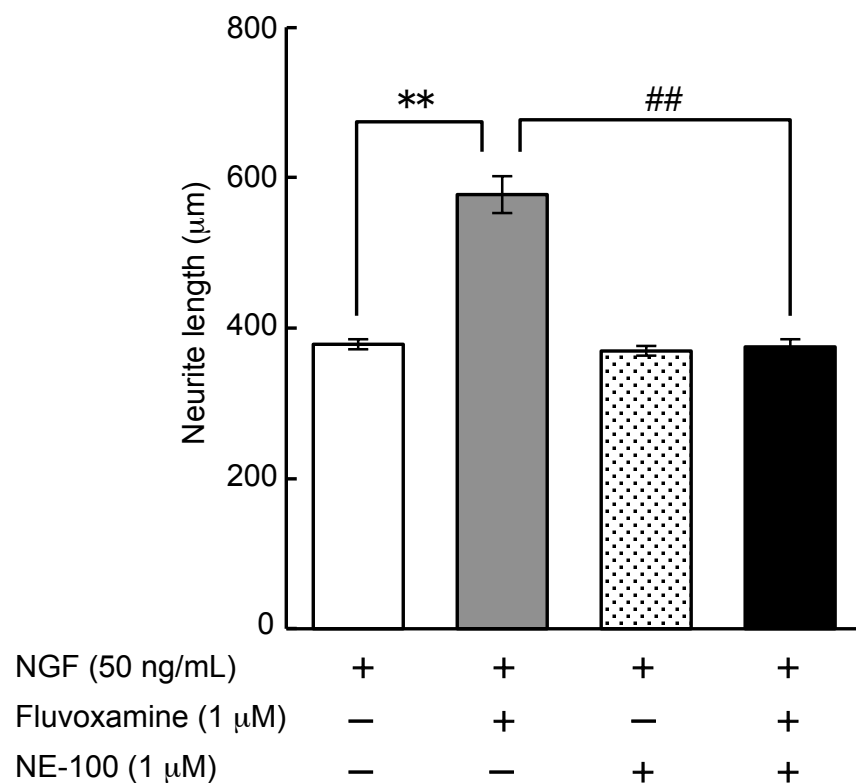
**Fig.14 Effect of NE-100 on PRE-084-induced neurite outgrowth elicited by NGF.**

PC12 cells were treated with NGF (50 ng/mL), PRE-084 (1  $\mu$ M) and NE-100 (1  $\mu$ M) for 24 h. The values represent the mean  $\pm$  S.E.M. (n = 6). \*\* Significantly different from NGF-treated group at  $p < 0.01$ . ## Significantly different from NGF plus PRE-084 group at  $p < 0.01$ .

### 3. フルボキサミンの NGF 誘発神経突起伸展増強作用に対する

#### NE-100 の影響

PC12 細胞に NE-100 (1  $\mu$ M) をあらかじめ添加し 4 時間培養させた後, NGF 存在下においてフルボキサミン (1  $\mu$ M) および NE-100 (1  $\mu$ M) を同時添加し, さらに 24 時間培養した。結果は Fig. 15 に示したように, フルボキサミンによる NGF 誘発神経突起伸展増強作用は, NE-100 の併用によって有意に拮抗された。



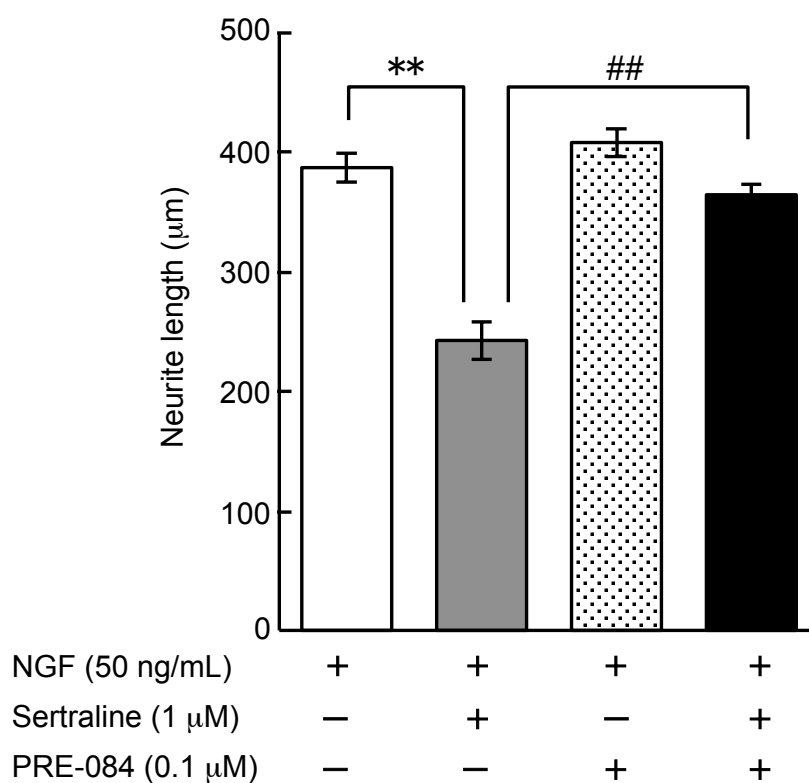
**Fig.15 Effect of NE-100 on enhancement effects of fluvoxamine on NGF-induced neurite outgrowth in PC12 cells.**

PC12 cells were treated with NGF (50 ng/mL), fluvoxamine (1  $\mu$ M) and NE-100 (1  $\mu$ M). The values represent the mean  $\pm$  S.E.M. (n = 6). \*\* Significantly different from NGF-treated group at  $p < 0.01$ . ## Significantly different from NGF plus fluvoxamine group at  $p < 0.01$ .

#### 4. セルトラリンの NGF 誘発神経突起伸展抑制作用に対する

##### PRE-084 の影響

PC12 細胞に NGF 存在下において、セルトラリン(1  $\mu\text{M}$ ) および PRE-084 (0.1  $\mu\text{M}$ )を同時添加し、24 時間培養した。結果は Fig. 16 に示したように、セルトラリンによる NGF 誘発神経突起伸展抑制作用は、それ自身で NGF 誘発神経突起伸展に影響を及ぼさない濃度の PRE-084 の併用によって有意に拮抗された。



**Fig.16 Effect of PRE-084 on inhibitory effects of sertraline on NGF-induced neurite outgrowth in PC12 cells.**

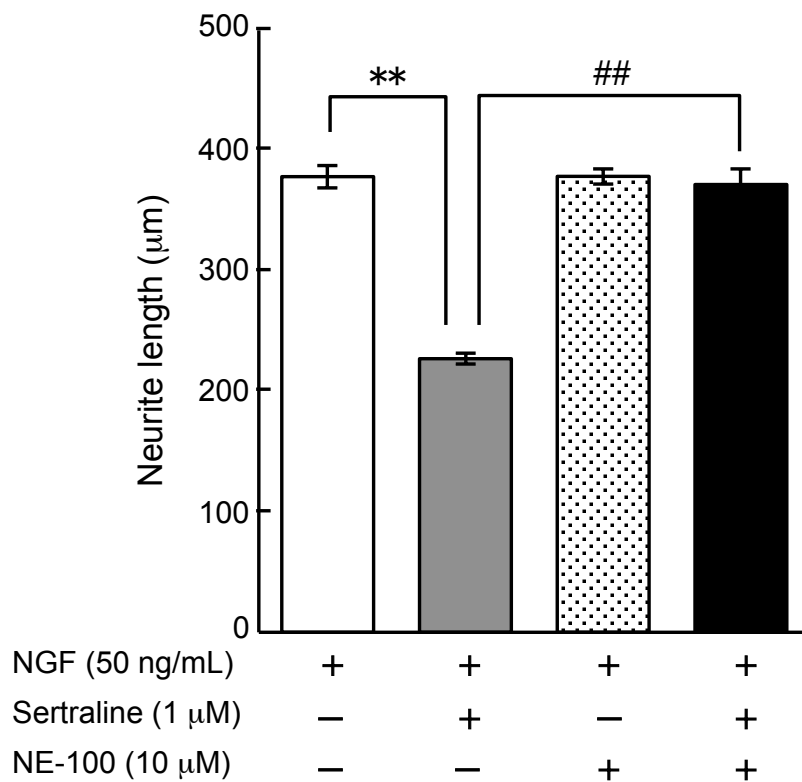
PC12 cells were treated with NGF (50 ng/mL), sertraline (1  $\mu\text{M}$ ) and PRE-084 (0.1  $\mu\text{M}$ ). The values represent the mean  $\pm$  S.E.M. (n = 6). \*\* Significantly different from NGF-treated group at  $p < 0.01$ . ## Significantly different from NGF plus sertraline group at  $p < 0.01$ .



## 5. セルトラリンの NGF 誘発神経突起伸展抑制作用に対する

### NE-100 の影響

PC12 細胞に NE-100 (1  $\mu\text{M}$ ) をあらかじめ添加し 4 時間培養した後, NGF (50 ng/mL)存在下において, セルトラリン (1  $\mu\text{M}$ ) および NE-100 を同時添加し, さらに 24 時間培養した。結果は Fig. 17 に示したように, セルトラリンによる NGF 誘発神経突起伸展抑制作用は, NE-100 の併用によって有意に拮抗された。



**Fig.17 Effect of NE-100 on inhibitory effects of sertraline on NGF-induced neurite outgrowth in PC12 cells.**

PC12 cells were treated with NGF (50 ng/mL), sertraline (1  $\mu\text{M}$ ) and NE-100 (1  $\mu\text{M}$ ). The values represent the mean  $\pm$  S.E.M. (n = 6). \*\* Significantly different from NGF-treated group at  $p < 0.01$ . ## Significantly different from NGF plus sertraline group at  $p < 0.01$ .

## 〔考察〕

第1章において、フルボキサミンは細胞毒性を示さない濃度でNGF誘発神経突起伸展に対して増強作用を有することを見出だした。一方、セルトラリンはNGF誘発神経突起伸展に対して抑制作用を示した。フルボキサミンおよびセルトラリンは、sigma-1受容体に対して高い親和性を示すことが報告されているが、NGF誘発神経突起伸展に対する作用におけるsigma-1受容体の関与の詳細は不明である。そこで、sigma-1受容体アゴニストであるPRE-084を用いて、NGF誘発神経突起伸展作用に対するフルボキサミンおよびセルトラリンの効果とsigma-1受容体との関連について検討した。

本実験結果で示したように、NGF誘発神経突起伸展に対するsigma-1受容体アゴニストであるPRE-084の作用を検討した結果、PRE-084は濃度依存的に増強作用を示した。Rossiらは、実験条件は異なるが、PRE-084がPC12細胞におけるNGF(2.5 ng/mL)誘発神経突起伸展を増強させることを報告しており、本研究での成績と同様である[55]。さらに、PRE-084の増強作用がsigma-1受容体アンタゴニストであるNE-100の併用によって有意に阻害されることを実証した。以上の成績から、NGF誘発神経突起伸展に対するPRE-084の増強作用はsigma-1受容体を刺激することにより発現することが明らかとなった。

次に、フルボキサミンによるNGF誘発神経突起伸展増強作用に対するsigma-1受容体アンタゴニストであるNE-100の影響について検討した。その結果、フルボキサミンによるNGF誘発神経突起伸展増強作用はNE-100の併用により有意に拮抗された。Nishimuraらも、NGF(2.5 ng/mL)誘発神経突起伸展がフルボキサミン1  $\mu$ Mで増強されることを報告しており、フルボキサミンがsigma-1受容体に対してアゴニストとして作用することを示唆している[46]。したがって、フルボキサミンはPRE-084と同様にsigma-1受容体のアゴニストと

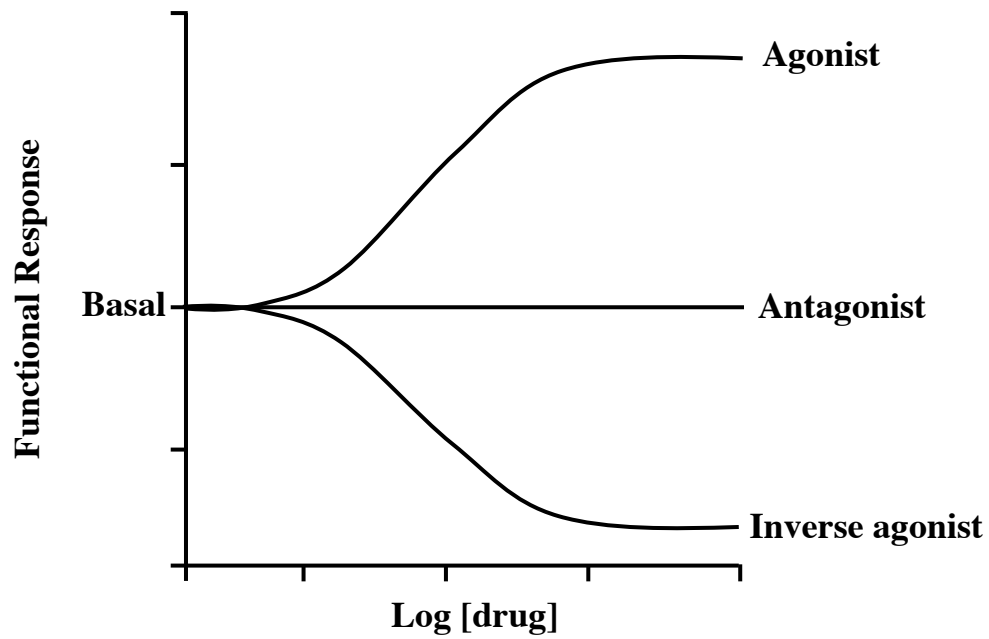
して作用し、NGF 誘発神経突起伸展を増強させた可能性が高い。

一方、セルトラリンは NGF 誘発神経突起伸展抑制作用を示したので、sigma-1 受容体アンタゴニストとして作用することが推測された。そこで、まず sigma-1 受容体アゴニストである PRE-084 を併用し検討した。結果は Fig.16 に示したように、それ自体で影響のない濃度の PRE-084 0.1  $\mu$ M の併用により、セルトラリンの抑制作用は拮抗された。次に、セルトラリンの NGF 誘発神経突起伸展抑制作用に対する sigma-1 受容体アンタゴニストである NE-100 の影響を検討した。その結果、NE-100 の併用によってもセルトラリンの抑制作用は有意に拮抗された。以上の結果より、セルトラリンの NGF 誘発神経突起伸展に対する抑制作用は、sigma-1 受容体を介して発現すること、さらに、セルトラリンは sigma-1 受容体に対して、アゴニスト様作用およびアンタゴニスト様作用を示すことが明らかとなった。

本章において、フルボキサミンは sigma-1 受容体アゴニスト作用、セルトラリンは sigma-1 受容体アゴニスト/アンタゴニスト様作用を有することが明らかとなった。Sugimoto らは、動物実験におけるフルボキサミンの抗うつ薬様作用が sigma-1 受容体アンタゴニストである BD1047 の併用により有意に拮抗されることを報告している[56]。さらに、Furuse らはフルボキサミン単独療法が精神病性うつ病に有効であること、また、パロキセチンが効果が弱いことを示す症例を報告している[57]。これらの知見から、sigma-1 受容体がうつ病に対するフルボキサミンの有効性に関係している可能性が高い。Fig. 18 にアゴニスト、アンタゴニストおよびインバースアゴニストの関係について示した[58,59]。インバースアゴニストはアゴニストとは反対、すなわち負の作用を示すリガンドであり、それ自体では作用を示さないアンタゴニストとは区別されている。また、インバースアゴニストの作用はアンタゴニストにより拮抗されることが知られている。セルトラリンは NGF 誘発神経突起伸展に対して抑制作用を示した。さらに、セルトラリンの抑制作用は sigma-1 受容体アゴニストおよびアンタゴニストの

併用により拮抗された。現在,  $\sigma$ -1 受容体リガンドにおいてインバーシアゴニストとして分類されている化合物はない。しかしながら, Wu らは  $\sigma$ -1 受容体アンタゴニストである BD1063 がブラジキニン誘発カルシウム放出に対して抑制作用を示すこと, また, この BD1063 の作用が  $\sigma$ -1 受容体アゴニストおよびアンタゴニストの併用により拮抗されることを報告しており, BD1063 が  $\sigma$ -1 受容体に対してインバーシアゴニスト様作用を持つと結論づけている[60]。以上の結果および知見から, セルトラリンは  $\sigma$ -1 受容体に対してインバーシアゴニストである可能性が示唆された。

また, 本研究の成績よりフルボキサミンは  $\sigma$ -1 受容体のアゴニスト, セルトラリンは  $\sigma$ -1 受容体のインバーシアゴニストとして作用することが示唆されることから, 両者を併用することで, 抗うつ作用が減弱する可能性が考えられる。セルトラリンは米国で最も処方されている抗うつ薬であることから, セルトラリンの神経新生におよぼす作用および  $\sigma$ -1 受容体との関連を解明することは重要である。



**Fig.18 The relationship between agonist, antagonist and inverse agonist.**

An agonist binds to a receptor and causes an activation action, and an antagonist antagonizes the agonist to attenuate the action of agonist. An antagonist alone does not show a response. Inverse agonists bind to the receptor and attenuate receptor constitutive activity.

### 第3章 デキサメタゾンによる NGF 誘発神経突起伸展および Akt リン酸化抑制作用に対するフルボキサミンの効果と sigma-1 受容体との関連

#### 〔緒言〕

うつ病の発症とグルココルチコイドの間には密接な関係があるという報告が多数存在する[61-64]。グルココルチコイドは、糖質、脂質、タンパク質の代謝や免疫反応およびストレス応答の制御に関わるなど生体のホメオスターシス維持に重要な役割を果たしている。さらに、グルココルチコイドは、細胞増殖、神経伝達物質の産生、神経細胞の分化および神経細胞死に関係していることが報告されている[65,66]。しかしながら、臨床で使用されているデキサメタゾンを含む合成グルココルチコイドは、長期投与により患者のうつ症状発現の危険性を高めることが問題となっている。Wolkowitz らは、高用量のグルココルチコイドを服用している患者の約 20%がうつ病、躁病を含む精神障害を発症し、75%が精神症状を訴えたことを報告している[67]。これらの知見から、現在ではうつ病の生化学的診断法としてデキサメタゾン抑制試験およびデキサメタゾン/コルチコトロピン放出ホルモン負荷試験が用いられている[68]。

一方、Wrobel らは、デキサメタゾンの単回投与および反復投与によりマウスにうつ病様行動を引き起こすこと、ならびにその行動に対してイミプラミンおよびアミトリプチリンなどの三環系抗うつ薬が有効であることを示している[69]。また、Terada らは、デキサメタゾンがグルココルチコイド受容体を介して、PC12 細胞における NGF 誘発神経突起伸展、さらに、その細胞内シグナル経路である Akt および ERK1/2 のリン酸化を阻害することを見出だした[27]。また、このモデルがデキサメタゾンや他のグルココルチコイドによるうつ病症状の発

現に関与する中枢神経系機能の一部を明らかにする為に有用であることを提案している。

第 1 章において、NGF 誘発神経突起伸展に対してフルボキサミン増強作用を示すが、セルトラリンは逆に抑制作用を示すことが明らかとなった。また、第 2 章において NGF 誘発神経突起伸展に対する SSRIs の作用が sigma-1 受容体と密接に関連していることが明らかとなった。そこで第 3 章では、まず NGF 誘発神経突起伸展に関連する Akt および ERK1/2 のリン酸化に対するフルボキサミンの影響を検討した。また、デキサメタゾンによる NGF 誘発神経突起伸展阻害および Akt リン酸化抑制作用に対するフルボキサミンの効果と sigma-1 受容体の関与を検討した。

## [実験材料ならびに実験方法]

### 1. 細胞培養

実験には PC12 細胞を用いた。細胞培養は、第 1 章の実験材料ならびに実験方法に述べた方法により行った。

### 2. 使用薬物

使用薬物は、NGF (murine NGF 2.5S derived from mouse submaxillary glands, (Alomone Labs, Ltd, Jerusalem, Israel)), デキサメタゾン塩酸塩 (デキサメタゾン; 和光, 大阪), フルボキサミン塩酸塩 (フルボキサミン; 東京化成, 東京) および NE-100 塩酸塩 (NE-100; Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, U.S.A) である。デキサメタゾンの化学構造は Fig.19 に示した (塩類は省略した)。

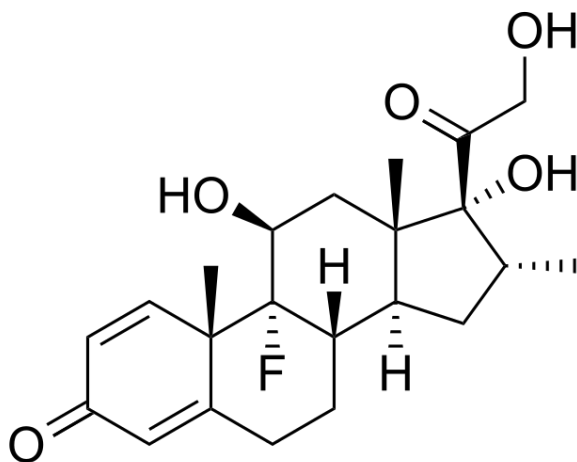


Fig.19 Chemical structure of dexamethasone.



### 3. 実験方法

#### 3-1. 神経突起の測定

PC12 細胞を type I collagen-coated 60 mm tissue culture dishes (イワキ, 東京) に  $1 \times 10^5$  細胞個播種し, 24 時間培養した。その後, 10% FBS, 1% ペニシリン/ストレプトマイシン含有 DMEM/F-12 にデキサメタゾン (1  $\mu$ M) を添加した培養液に交換し, 24 時間培養した。次に, ダルベッコりん酸緩衝生理食塩水 (D-PBS; ナカライテスク, 東京) でシャーレを洗浄した。その後, 5% FBS, 1% ペニシリン/ストレプトマイシン含有 DMEM/F-12 を培養液とし, 培養液に NGF (50 ng/mL) および各薬物を添加し, さらに 24 時間培養した。培養 24 時間後に倒立顕微鏡下 (ECLIPSE TS100, ニコン, 東京) でデジタルカメラ (Digital Sight DS-L2 system, ニコン, 東京) を用いて撮影した。各ディッシュごとに 10-15 個の細胞を含む無作為に選んだ 5 視野の画像を得た。撮影した画像は各画像ごとに視野内の 10 細胞の神経突起の長さを ImageJ Software (freely available from the National Institutes of Health, Bethesda, MD, U.S.A) にて測定した。

#### 3-2. Western blotting 解析

PC12 細胞を播種し, 培養 24 時間後に DMEM/F-12 に 5% FBS を加えたものを培養液とし, 培養液に NGF (50 ng/mL) および各薬物を添加した。薬物添加 0, 5, 10, 20, 30 および 60 分後に氷冷したトリス緩衝生理食塩水 (TBS; Bio-Rad, Hercules, CA, U.S.A) を用いて細胞を回収した。その後, 氷上で PathScan Sandwich ELISA Lysis Buffer (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, U.S.A) で 5 分間反応させ, 細胞を溶解した。遠心分離により細胞破片を除去し, Bicinchoninic Acid (BCA) Assay Kit (Pierce, Rockford, IL, U.S.A) を用いて溶解物中のタンパク質濃度を測定した。等量のタンパク質を含むサンプルを電気泳動

により分離し、続いて polyvinylidene fluoride (PVDF) メンブレン上へ転写した。1 次抗体は、anti-phospho-Akt (p-Akt) antibody (Ser473; Cell Signaling Technology), anti-Akt antibody (Cell Signaling Technology), anti-phospho-ERK1 (T202/Y204)/ERK2 (T185/Y187) (p-ERK1/2) antibody (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), and anti-ERK1/2 antibody (R&D Systems)を用いた。HRP 標識 2 次抗体は、Anti-rabbit IgG, peroxidase-linked species-specific whole antibody from donkey (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, U.S.A) を使用した。その後、化学発光試薬 (ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare UK Ltd., Little Chalfont, Buckinghamshire, UK)) および RX-U Fuji X-ray film (Fuji Film, 東京) を用いて検出した。結果の解析には、ImageJ software version 1.48v を使用した。

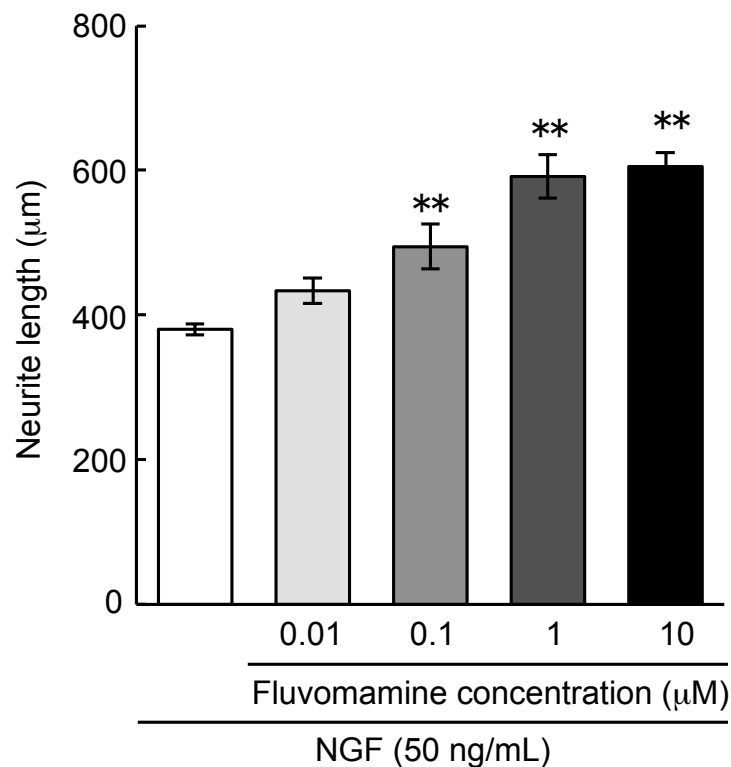
### 3-3. 統計処理

統計学的有意差は、一元配置分散分析 (ANOVA) および Tukey 法を用いて検定した。実験成績はすべて平均値 ± 標準誤差で示した。

## 〔実験成績〕

### 1. PC12 細胞における NGF 誘発神経突起伸展に対するフルボキサミンの作用

PC12 細胞に NGF (50 ng/mL) およびフルボキサミン (0.01, 0.1, 1, and 10  $\mu$ M) を添加し、24 時間作用させた。Fig.6A と同じ成績であるが、再度検討した。結果は Fig. 20 に示したように、フルボキサミンは NGF 誘発神経突起伸展作用に対して濃度依存的な増強効果を示した。有意な効果は 0.1, 1 および 10  $\mu$ M で観察された。



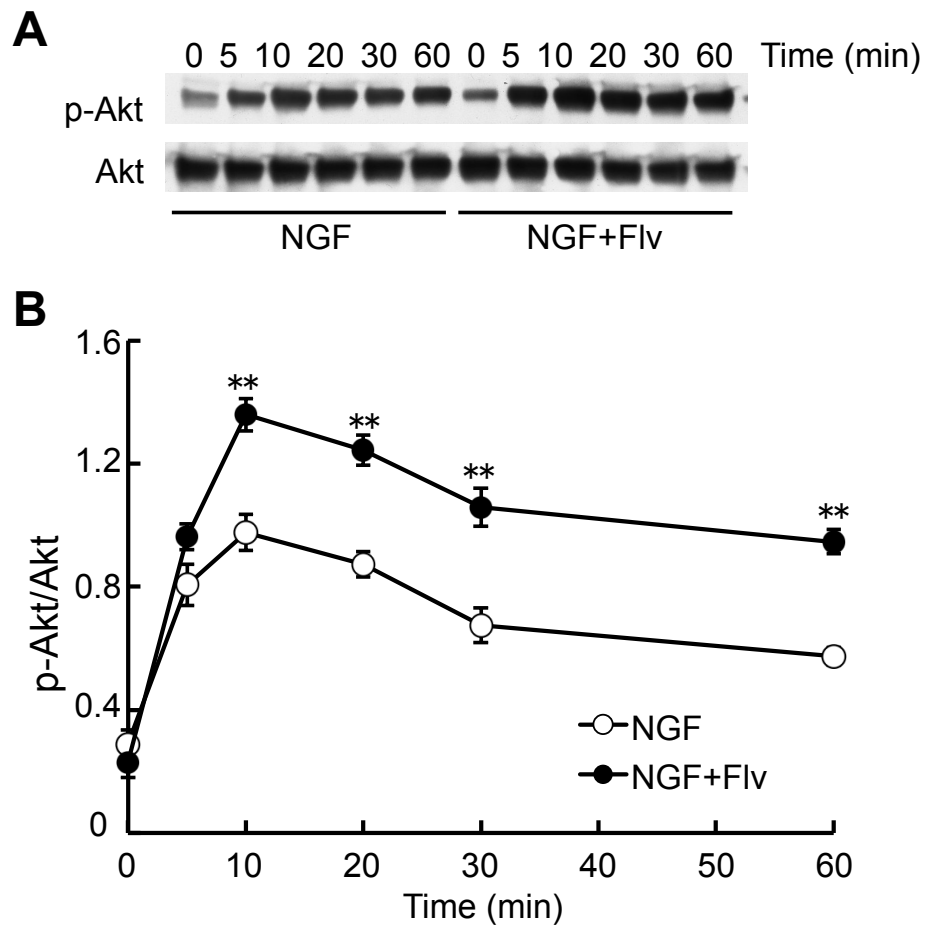
**Fig.20 Effect of fluvomamine on NGF-induced neurite outgrowth in PC12 cells.**

PC12 cells were treated with NGF (50 ng/mL) or NGF plus fluvomamine (0.01, 0.1, 1, and 10  $\mu$ M). The values represent the mean  $\pm$  S.E.M. (n = 9). \*\* Significantly different from NGF-treated group at  $p < 0.01$ .

## 2. Akt および ERK1/2 のリン酸化に対するフルボキサミンの作用

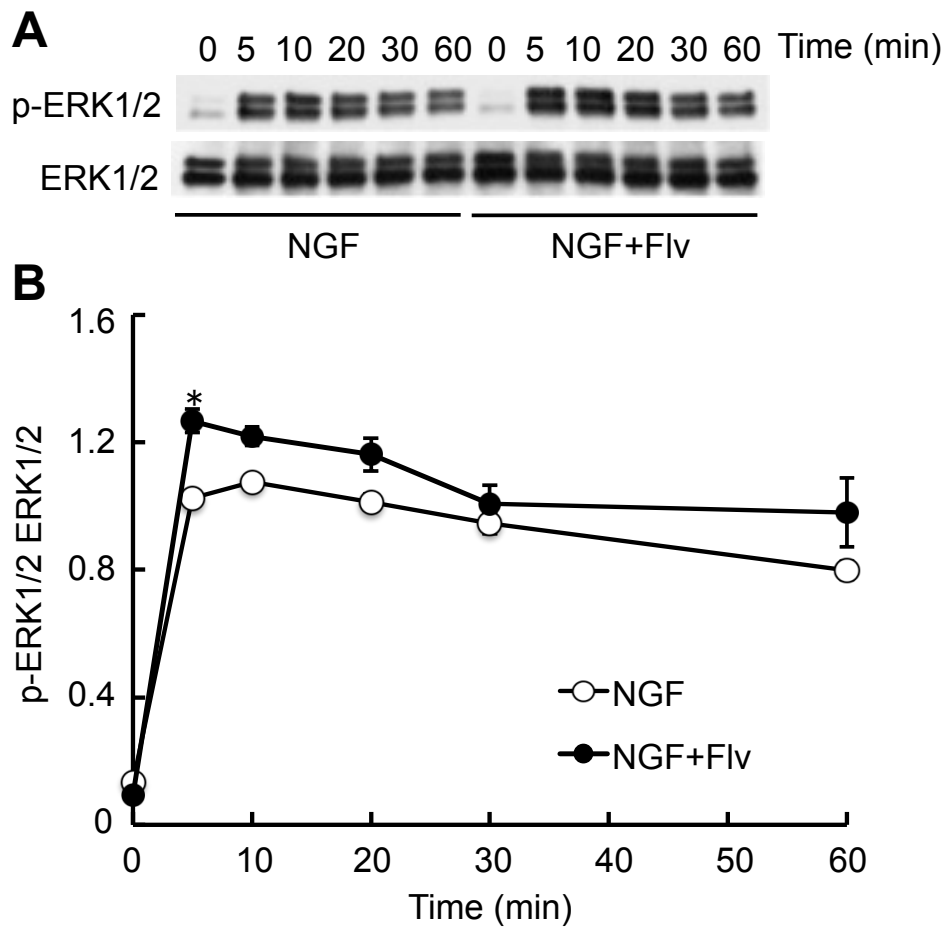
NGF 誘発神経突起伸展作用に関連する Akt および ERK1/2 のリン酸化に対するフルボキサミンの影響を検討した。PC12 細胞を播種し 24 時間培養した後、NGF (50 ng/mL) または NGF およびフルボキサミン (10  $\mu$ M) を添加した。薬物添加後 0, 5, 10, 20, 30, および 60 分後に細胞を回収し western blotting 解析を行った。NGF を添加した細胞の Akt のリン酸化は, Fig. 21A, B に示したように, 添加 5 分後より増加し, 10 分後にピークに達したのち, 徐々に減少した。NGF 存在下でフルボキサミンを同時添加した細胞の Akt のリン酸化も添加 5 分後より増加し, 10 分後にピークに達したのち, 徐々に減少した。フルボキサミンによる Akt のリン酸化レベルの増加は, 薬物添加 10 分後のピーク時から 60 分後まで有意差がみられた。

NGF を添加した細胞の ERK1/2 のリン酸化は, Fig. 22A, B に示したように, 添加 5 分後より増加し, 添加 60 分後まで持続した。NGF 存在下でフルボキサミンを同時添加した細胞の ERK1/2 のリン酸化も同様に添加 5 分後より増加し, 添加 60 分後まで持続した。フルボキサミンによる ERK1/2 のリン酸化レベルの増加は, 薬物添加 5 分後のみ有意差がみられた。



**Fig.21 Time course changes in the effect of fluvoxamine on NGF-induced phosphorylation of Akt.**

PC12 cells were treated with NGF (50 ng/mL) or NGF plus fluvoxamine (10  $\mu$ M). (A) Representative image of western blot. (B) Relative protein level quantification data from western blots. The values represent the mean  $\pm$  S.E.M. from three independent experiments. \*\* Significantly different from NGF-treated group at  $p < 0.01$ . Flv: fluvoxamine, p-Akt: phosphorylated Akt,



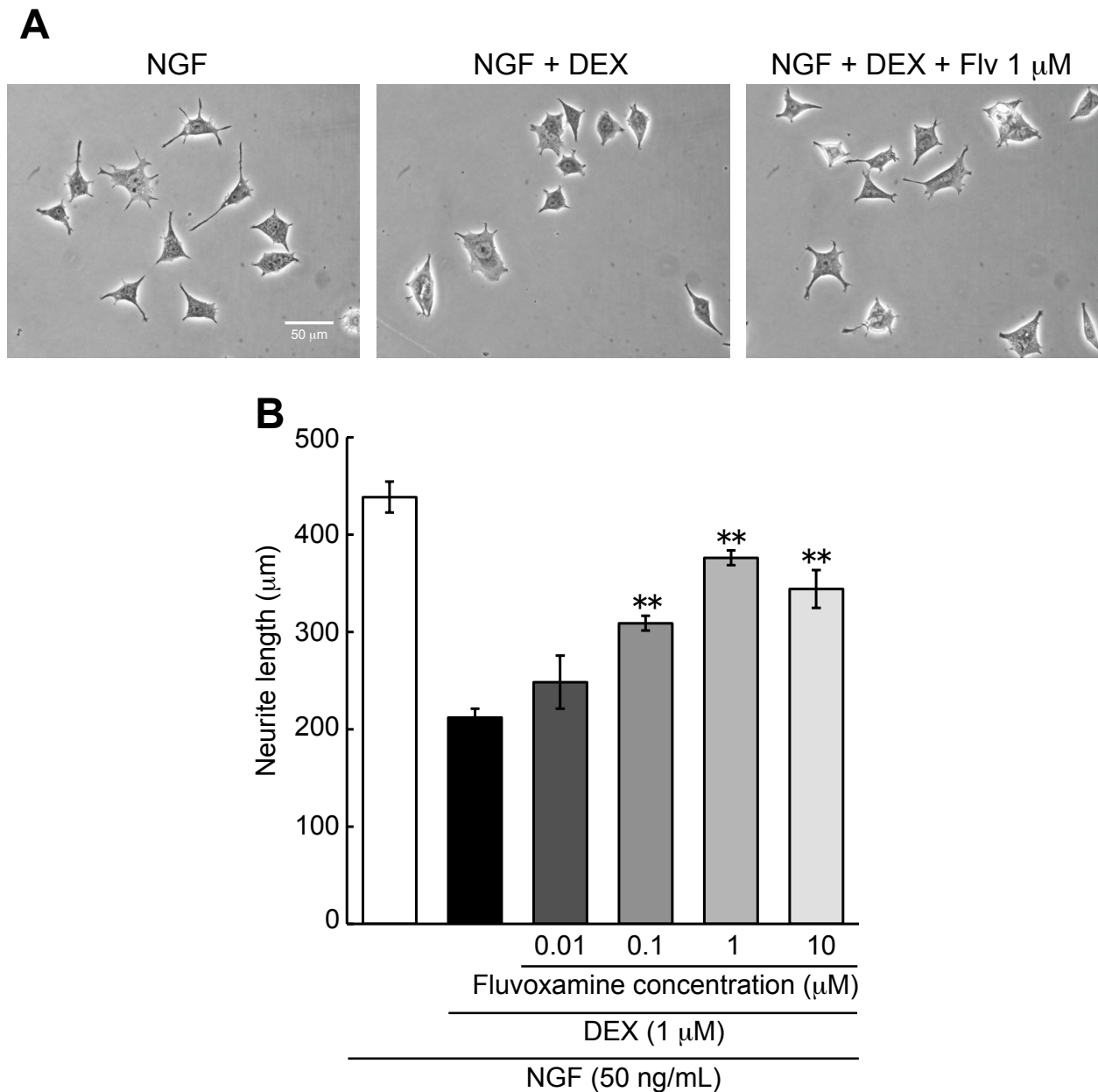
**Fig.22 Time course changes in the effect of fluvoxamine on NGF-induced phosphorylation of ERK1/2.**

PC12 cells were treated with NGF (50 ng/mL) or NGF plus fluvoxamine (10  $\mu$ M). (A) Representative image of western blot. (B) Relative protein level quantification data from western blots. The values represent the mean  $\pm$  S.E.M. from three independent experiments. \* Significantly different from NGF-treated group at  $p < 0.05$ . p-ERK1/2: phosphorylated ERK1/2

### 3. デキサメタゾンによる NGF 誘発神経突起伸展抑制作用に対する

#### フルボキサミンの効果

PC12 細胞をデキサメタゾン (1  $\mu\text{M}$ ) で 24 時間前処理した後, D-PBS で洗浄し, NGF (50 ng/mL) およびフルボキサミン (0.01, 0.1, 1, および 10  $\mu\text{M}$ ) を添加し 24 時間作用させた。Fig. 23A に代表例を示した。デキサメタゾン (1  $\mu\text{M}$ ) は NGF 誘発神経突起伸展に対して抑制作用を示した (Fig. 23B)。また, フルボキサミンはデキサメタゾン前処理による NGF 誘発神経突起伸展の抑制に対して濃度依存的な回復効果を示した (Fig. 23B)。有意な効果は 0.1, 1 および 10  $\mu\text{M}$  の濃度で観察された。



**Fig.23 Effect of fluvoxamine on the inhibition by DEX of NGF-induced neurite outgrowth.**

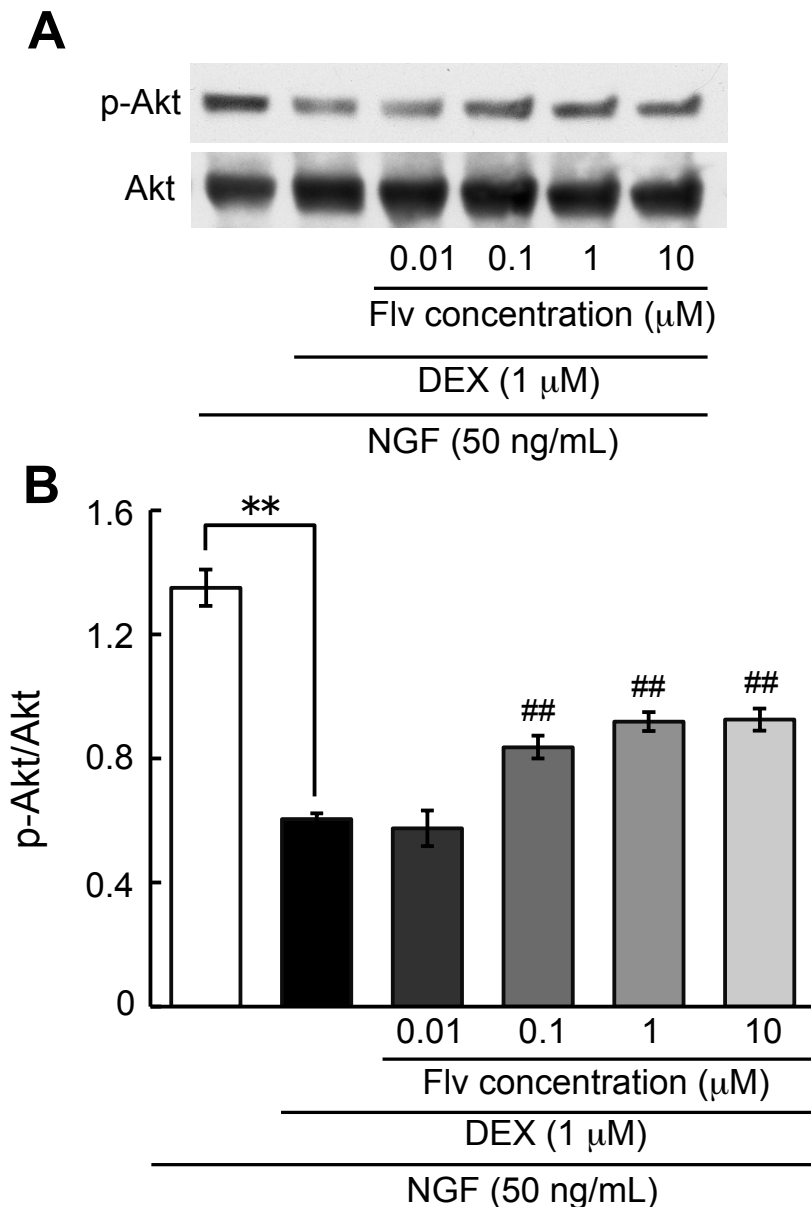
PC12 cells were pretreated for 24 h with vehicle or DEX (1  $\mu$ M), followed by washing in D-PBS and treatment with NGF or NGF plus fluvoxamine for 24 h. (A) Representative image of phase-contrast photomicrographs. (B) Quantification data on neurite length. The values represent the mean  $\pm$  S.E.M. (n = 9). \*\*: Significantly different from NGF plus DEX-treated group at  $p < 0.01$ . DEX: dexamethasone, Flv: fluvoxamine



#### 4. デキサメタゾンによる NGF 誘発 Akt リン酸化抑制作用に対する

##### フルボキサミンの効果

PC12 細胞をデキサメタゾン (1  $\mu\text{M}$ ) で 24 時間前処理した後, NGF (50 ng/mL) または NGF およびフルボキサミン (10  $\mu\text{M}$ ) を添加し, 10 分後に細胞を回収し western blotting 解析を行った。Fig. 24A は western blotting 解析による代表的なバンド画像を示した。Fig. 24B に western blotting 解析によるタンパク質レベルの定量的データを示した。結果は Fig. 24A, B に示したように, デキサメタゾン (1  $\mu\text{M}$ ) は NGF 誘発 Akt リン酸化を有意に阻害した。一方, フルボキサミンはデキサメタゾンにより阻害された NGF 誘発 Akt リン酸化を濃度依存的に回復させた。有意な効果は 0.1, 1 および 10  $\mu\text{M}$  の濃度で観察された。



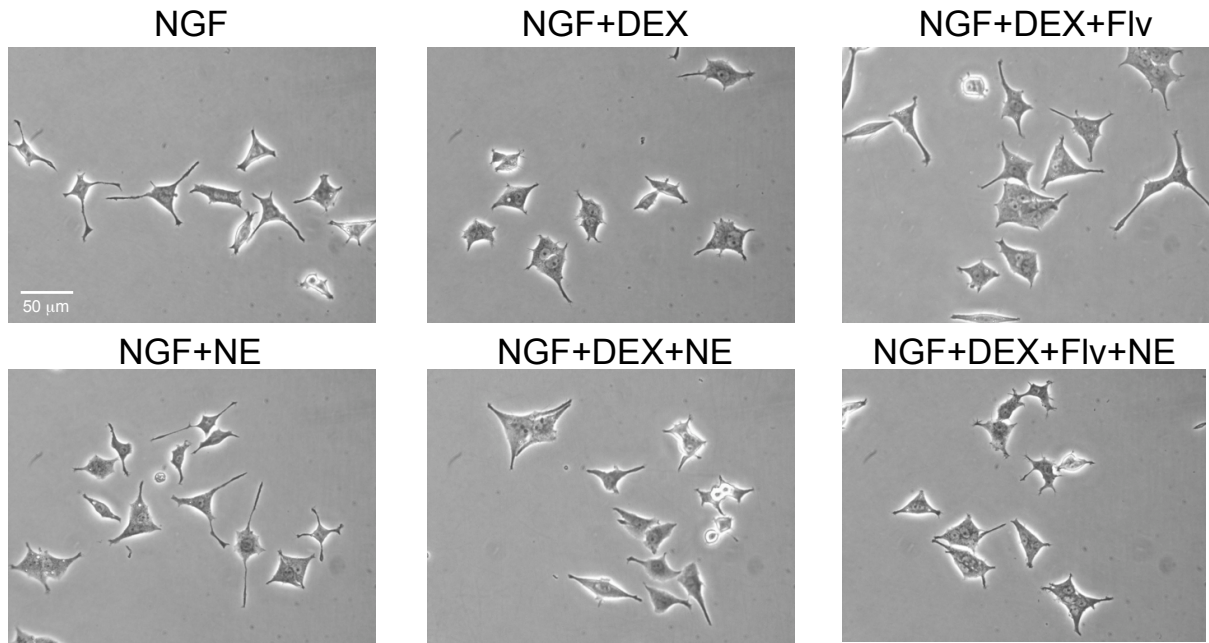
**Fig.24 Effect of fluvoxamine on the decrease of NGF-induced phosphorylation of Akt by DEX.**

PC12 cells were pretreated for 24 h with vehicle or DEX ( $1 \mu\text{M}$ ), followed by washing in D-PBS and treatment with NGF ( $50 \text{ ng/mL}$ ) or NGF plus fluvoxamine for 10 min. (A) Representative image of western blot. (B) Relative protein level quantification data from western blot. The values represent the mean  $\pm$  S.E.M. from three independent experiments. \*\*: Significantly different from NGF-treated group at  $p < 0.01$ . ##: Significantly different from NGF plus DEX group at  $p < 0.01$ . DEX: dexamethasone, Flv: fluvoxamine

## 5. デキサメタゾンによる NGF 誘発神経突起伸展抑制作用に対する

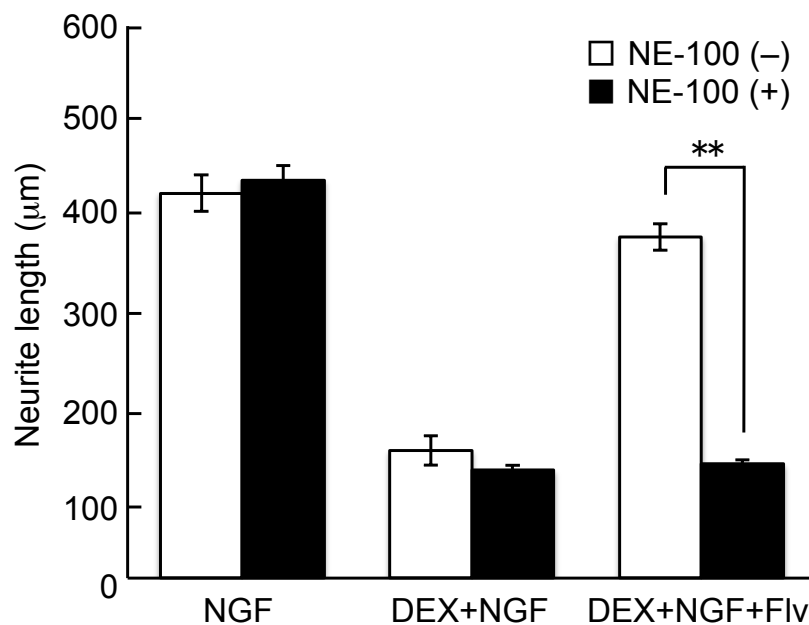
### フルボキサミンの効果における NE-100 の影響

PC12細胞をデキサメタゾン (1  $\mu$ M) で24時間前処理した後、D-PBSで洗浄し、NE-100 (10  $\mu$ M) の存在下または非存在下で4時間培養した。その後、NGF (50 ng/mL) およびフルボキサミン (1  $\mu$ M) を添加し24時間培養した。Fig. 25に代表例を示した。結果は Fig. 26に示したように、sigma-1受容体アンタゴニストであるNE-100は、デキサメタゾン (1  $\mu$ M) の前処理によるNGF誘発神経突起伸展抑制作用に対して単独では10  $\mu$ Mの濃度においても有意な影響を及ぼさなかった。一方、デキサメタゾン前処理により抑制されたNGF誘発神経突起伸展作用に対するフルボキサミン (1  $\mu$ M) の回復効果は、NE-100 (10  $\mu$ M) の併用により有意に拮抗された。



**Fig.25 Morphological changes by NE-100 on fluvoxamine improvement of neurite outgrowth inhibition by DEX.**

Representative images of phase-contrast photomicrographs. PC12 cells were pretreated for 24 h with vehicle or DEX (1  $\mu$ M), followed by washing in D-PBS and pre-incubated in the presence or absence of NE-100 (10  $\mu$ M) for 4 h. Then, PC12 cells were treated with NGF, fluvoxamine (1  $\mu$ M) for 24 h. DEX: dexamethasone, Flv: fluvoxamine, NE: NE-100. Scale bar = 50  $\mu$ m.



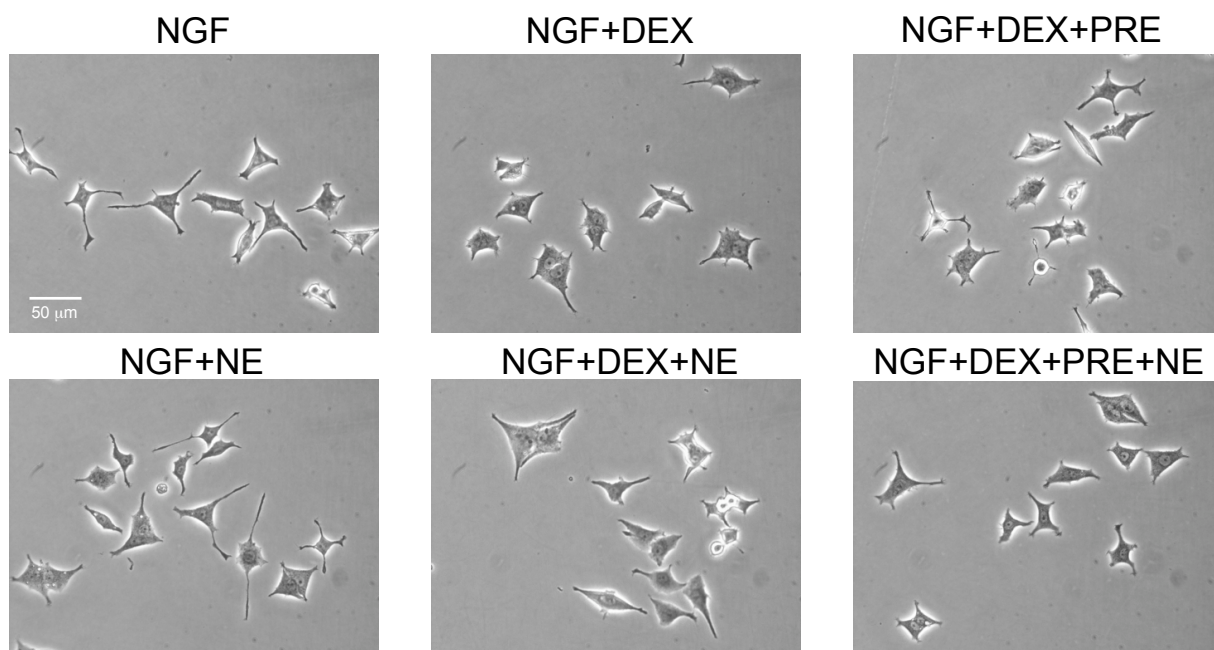
**Fig.26 Effect of NE-100 on fluvoxamine improvement of neurite outgrowth inhibition by DEX.**

PC12 cells were pretreated for 24 h with vehicle or DEX (1  $\mu\text{M}$ ), followed by washing in D-PBS and pre-incubated in the presence or absence of NE-100 (10  $\mu\text{M}$ ) for 4 h. Then, PC12 cells were treated with NGF, fluvoxamine (1  $\mu\text{M}$ ) for 24 h. The values represent the means  $\pm$  S.E.M. (n = 9). \*\*: Significantly different from DEX plus NGF plus Flv group at  $p < 0.01$ . DEX: dexamethasone, Flv: fluvoxamine

## 6. デキサメタゾンによる NGF 誘発神経突起伸展抑制作用に対する

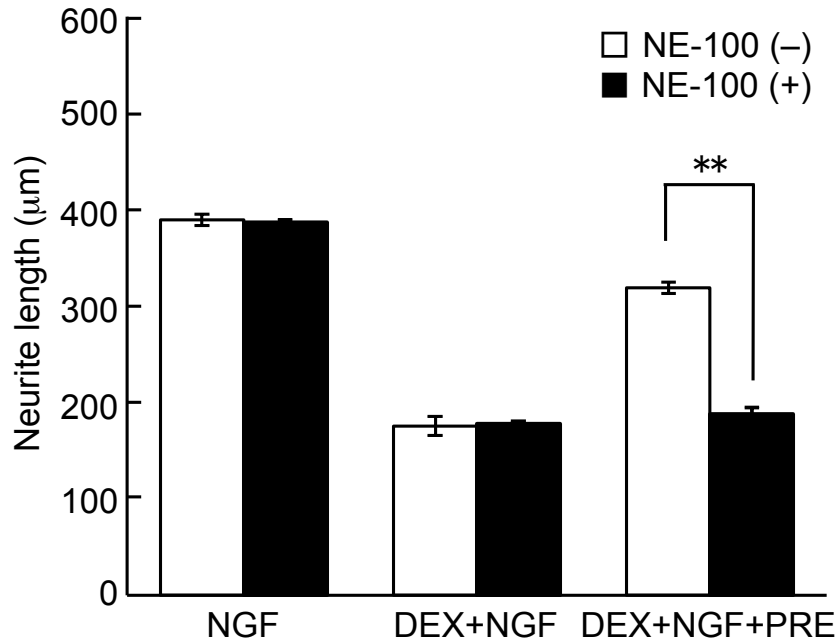
### PRE-084 の効果における NE-100 の影響

PC12細胞をデキサメタゾン (1  $\mu\text{M}$ ) で24時間前処理した後、D-PBSで洗浄し、NE-100 (10  $\mu\text{M}$ ) の存在下または非存在下で4時間培養した。その後、NGF (50 ng/mL) および PRE-084 (1  $\mu\text{M}$ ) を添加し24時間培養した。Fig. 27に代表例を示した。結果は Fig. 28 に示したように、sigma-1 受容体アンタゴニストである NE-100 は、デキサメタゾン (1  $\mu\text{M}$ ) の前処理による NGF 誘発神経突起伸展抑制作用に対して単独では10  $\mu\text{M}$  の濃度においても有意な影響を及ぼさなかった。一方、デキサメタゾン前処理により抑制された NGF 誘発神経突起伸展作用に対する sigma-1 受容体アゴニストである PRE-084 (1  $\mu\text{M}$ ) の回復効果は、NE-100 (10  $\mu\text{M}$ ) の併用により有意に拮抗された。



**Fig.27 Morphological changes by NE-100 on PRE-084 improvement of neurite outgrowth inhibition by DEX.**

Representative images of phase-contrast photomicrographs. PC12 cells were pretreated for 24 h with vehicle or DEX (1  $\mu$ M), followed by washing in D-PBS and pre-incubated in the presence or absence of NE-100 (10  $\mu$ M) for 4 h. Then, PC12 cells were treated with NGF, PRE-084 (1  $\mu$ M) for 24 h. DEX: dexamethasone, PRE: PRE-084, NE: NE-100. Scale bar = 50  $\mu$ m.



**Fig.28 Effect of NE-100 on PRE-084 improvement of neurite outgrowth inhibition by DEX.**

PC12 cells were pretreated for 24 h with vehicle or DEX (1  $\mu$ M), followed by washing in D-PBS and pre-incubated in the presence or absence of NE-100 (10  $\mu$ M) for 4 h. Then, PC12 cells were treated with NGF, PRE-084 (1  $\mu$ M) for 24 h. The values represent the means  $\pm$  S.E.M. (n = 9). \*\*: Significantly different from DEX plus NGF plus PRE group at  $p < 0.01$ . DEX: dexamethasone, PRE: PRE-084



## 〔考察〕

本章において、フルボキサミンは NGF 誘発 Akt リン酸化のレベルを著明に増強させ、また、NGF 誘発 ERK1/2 リン酸化のレベルも軽度に増強させることが明らかとなった。PC12 細胞における NGF 誘発神経突起伸展の代表的な細胞内シグナル経路は、TrkA 受容体の活性化を介する Ras / ERK シグナル伝達経路およびホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ (PI3K) / Akt シグナル伝達経路である[70-73]。さらに、Moriguchi らは、カルシウムカルモジュリン依存性タンパク質キナーゼ IV (CaMKIV) 欠損マウスにおける Akt リン酸化の減少が、フルボキサミンによる sigma-1 受容体の活性化を介して有意に改善されることを報告している[74]。本実験成績で示したように、NGF は Akt のリン酸化レベルを上昇させた。さらに、フルボキサミンは NGF 誘発 Akt リン酸化のレベルを強力かつ持続的に増強させた。また、NGF は ERK1/2 のリン酸化レベルを上昇させ、フルボキサミンは NGF 誘発 ERK1/2 リン酸化のレベルを有意に増強させた。しかしながら、その効果は弱く一過性であった。以上の成績から、フルボキサミンの NGF 誘発神経突起伸展作用に対する増強効果は、ERK1/2 よりも Akt のリン酸化が主に関与している可能性が判明した。

Terada らは、デキサメタゾンが PC12 細胞における NGF 誘発神経突起伸展作用を抑制することを見出だしている[27]。さらに、デキサメタゾンが NGF の刺激によって開始される神経突起伸展シグナル経路において Akt および ERK1/2 のリン酸化レベルを減少させることも報告している。これらのデキサメタゾンによる減少作用は、グルココルチコイド受容体アンタゴニスト RU38486 の添加によって拮抗された。これらの知見から、Terada らは、デキサメタゾンのグルココルチコイド受容体への結合が、Akt および ERK1/2 のリン酸化を阻害することによって NGF 誘発神経突起伸展作用を抑制することを明らかにしている[27]。

本実験成績で示したように、フルボキサミンはデキサメタゾンによる NGF 誘発神経突起伸展抑制作用を回復し、また、デキサメタゾンによる Akt のリン酸化の減少を回復させた。以上の知見および本実験成績から、デキサメタゾンによる NGF 誘発神経突起伸展抑制作用に対するフルボキサミンの回復効果は、Akt のリン酸化を介して発現している可能性が考えられる。

フルボキサミンは、sigma-1受容体に対して高い親和性を示すことが知られている[17,45]。Sigma-1受容体は、精神疾患に対して重要な役割を担っていること[57,75,76]、およびsigma-1受容体アゴニストであるSA4503は、抗うつ作用を示すことが報告されている[77]。さらにNishimuraらは、SA4503がNGF誘発神経突起伸展作用を増強し、その効果がPI3K阻害剤およびERK1/2阻害剤の併用により阻害されることを見出している[46]。これらの知見は、PI3K/Akt経路およびRas/ERK1/2経路がsigma-1受容体の細胞シグナル経路として、重要な役割を果たしている可能性を示している。したがって、PI3K/Akt経路はデキサメタゾンによるNGF誘発神経突起伸展抑制作用に対するフルボキサミンの回復効果に重要な役割を果たしていると考えられる。一方、臨床において、いくつかの抗うつ薬がグルココルチコイド投与によって生ずる精神症状を抑制することが報告されている[78]。また、その作用機序として、イミプラミンなどの三環系抗うつ薬は、グルココルチコイドを介して遺伝子転写を阻害することが報告されている[78]。さらに、コルチゾール合成阻害薬が、抗うつ効果を示すことも見出だされている[79]。これらの知見は、抗うつ効果がグルココルチコイドの機能に関与することを示唆しているが、フルボキサミンとグルココルチコイドの関連については、未だ不明な点も残されており、さらなる検討が必要であると考えられる。

次に、デキサメタゾンによる NGF 誘発神経突起伸展抑制作用に対するフルボキサミンの回復効果が sigma-1 受容体と関連するか否かを検討した。その結果、デキサメタゾンによる NGF 誘発神経突起伸展抑制作用に対するフルボキサミンの回復効果は、代表的な sigma-1 受容体アンタゴニストである NE-100[80]の

併用により有意に拮抗された。また、デキサメタゾンによる NGF 誘発神経突起伸展抑制作用に対する  $\sigma$ -1 受容体アゴニストである PRE-084 の回復作用も NE-100 の併用により有意に拮抗された。これらの成績より、デキサメタゾンによる NGF 誘発神経突起伸展に対するフルボキサミンの回復効果は、 $\sigma$ -1 受容体と密接に関連していることが明らかとなった。本研究結果は、フルボキサミンの抗うつ効果には  $\sigma$ -1 受容体が少なくとも部分的な役割を果たす可能性をさらに裏付けている。これらの知見から、PC12 細胞におけるデキサメタゾンによる NGF 誘発神経突起伸展抑制作用に対するフルボキサミンの効果は、Akt のリン酸化および  $\sigma$ -1 受容体を含む機構を介して生じたと結論づけることができる。さらに、このモデルは中枢神経系における、デキサメタゾンおよび他のグルココルチコイドの神経新生に及ぼす影響のメカニズムを解明するために有用である。

## 総括

本研究は、神経突起伸展に対する抗うつ薬の作用および sigma-1 受容体の関与の解明を目的として *in vitro* モデルを用いて検討した。

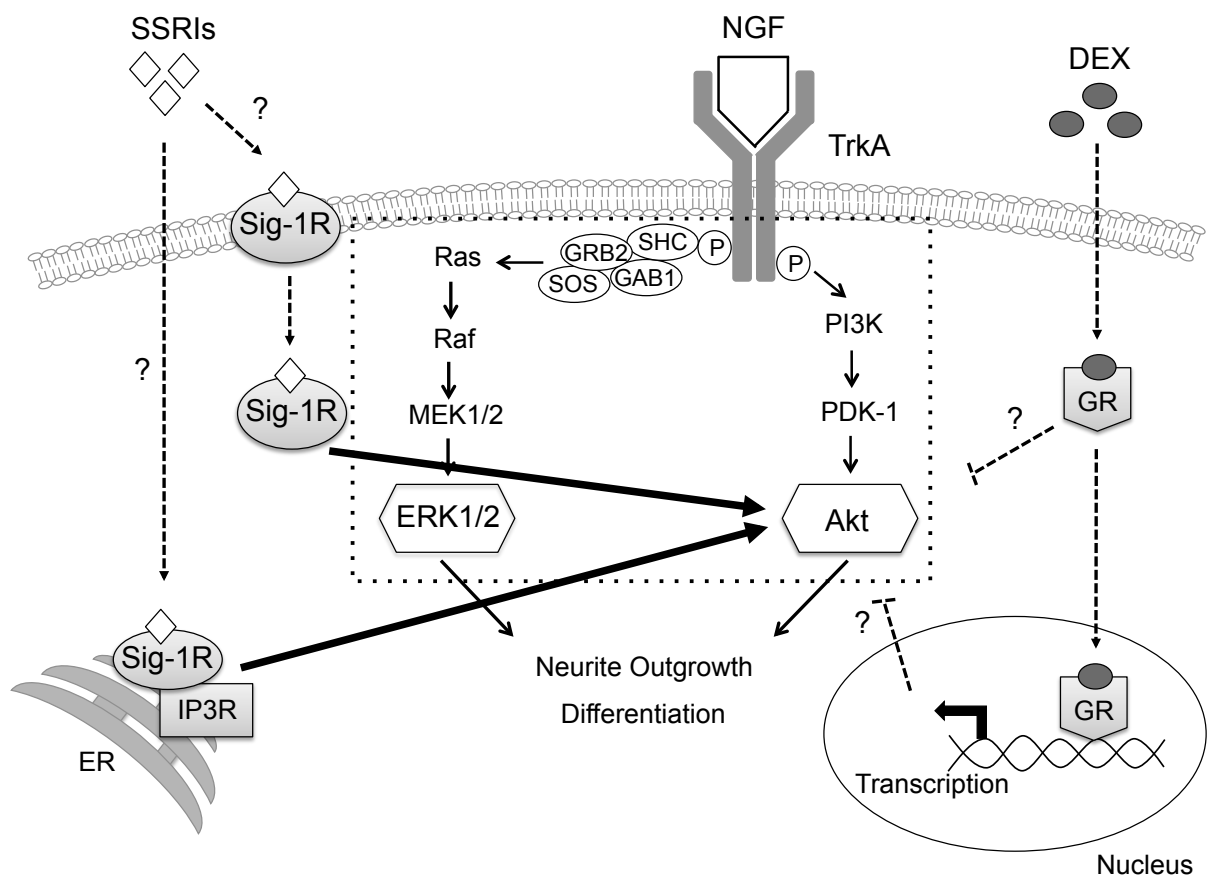
第 1 章では、SSRIs であるフルボキサミンは PC12 細胞における NGF 誘発神経突起伸展作用に対して増強効果を示すこと、一方、セルトラリンは抑制効果を示すこと、パロキセチンは効果を示さないことが明らかとなった。また、フルボキサミンおよびセルトラリンの NGF 誘発神経突起伸展作用に対する効果は、PC12 細胞の細胞生存率に影響を与えない濃度において観察された。したがって、NGF 誘発神経突起伸展作用に対するフルボキサミンおよびセルトラリンの効果は、PC12 細胞に対する細胞毒性によるものではないことが判明した。また、NGF 誘発神経突起伸展作用に対する効果は、本来の SSRIs の作用機序であるセロトニン再取り込み阻害作用によるものではないことが明らかとなった。

第 2 章では、NGF 誘発神経突起伸展に対するフルボキサミンの増強効果が sigma-1 受容体アンタゴニストである NE-100 の併用により拮抗されることが明らかとなった。さらに、NGF 誘発神経突起伸展に対するセルトラリンの抑制効果が、PRE-084 および NE-100 の併用により拮抗されることも明らかにした。Sigma-1 受容体アゴニストである PRE-084 は、NGF 誘発神経突起伸展に対して増強効果を示し、その増強効果は、NE-100 の併用により拮抗された。したがって、NGF 誘発神経突起伸展に対するフルボキサミンおよびセルトラリンの効果は、sigma-1 受容体を介して発現していることが判明した。また、フルボキサミンは sigma-1 受容体のアゴニストとして、セルトラリンは sigma-1 受容体のインバースアゴニストとして作用する可能性が示唆された。

第3章では、フルボキサミンが NGF 誘発 Akt リン酸化のレベルを著明に増強させ、また、NGF 誘発 ERK1/2 のリン酸化レベルも軽度に増強させることが明らかとなった。したがって、フルボキサミンによる NGF 誘発神経突起伸展増強作用には、主に Akt のリン酸化が関与していることが判明した。フルボキサミンは、デキサメタゾンによる NGF 誘発神経突起伸展抑制作用を有意に回復させた。また、フルボキサミンは、デキサメタゾンによる NGF 誘発 Akt リン酸化レベルの減少作用を回復させた。さらに、デキサメタゾンによる NGF 誘発神経突起伸展抑制作用に対するフルボキサミンの回復効果は、sigma-1 受容体アンタゴニストである NE-100 の併用により拮抗された。また、選択的 sigma-1 受容体アゴニストである PRE-084 もデキサメタゾンによる NGF 誘発神経突起伸展抑制作用を有意に回復させた。この効果は、NE-100 により拮抗された。以上の成績から、デキサメタゾンによる NGF 誘発神経突起伸展抑制作用に対するフルボキサミンの回復効果は、Akt のリン酸化および sigma-1 受容体を介して発現していることが明らかとなった (Fig.29)。

本研究では、抗うつ薬の新たな共通標的分子として sigma-1 受容体に着目し解析を行った。本研究の成績より、SSRIs は本実験モデルにおいてそれぞれ異なる作用を示し、フルボキサミンは sigma-1 受容体アゴニスト、セルトラリンは sigma-1 受容体インバースアゴニストであることが明らかとなったことから、sigma-1 受容体に対する作用だけでは抗うつ効果を説明することはできない。しかしながら、Kishimoto らは興味深いことに、臨床現場においてフルボキサミンとセルトラリンが相反した作用を示した症例を報告している [81]。また、SSRIs の中でもフルボキサミンは不安、強迫症状および妄想に有効性の高い鎮静タイプとされ、一方、セルトラリンおよびパロキセチンは注意欠陥症状や陰性症状に有効性の高い賦活化タイプとされており、それぞれ異なるタイプの症状に有効性が分かれている [82]。これらの知見から、フルボキサミンおよびセルトラリ

ンのsigma-1受容体に対する作用の違いが有効性を示す症状が異なる要因であると考えられる。また、フルボキサミンはステロイド誘発性神経突起伸展抑制作用に対し、sigma-1受容体を介して回復作用を示すことが明らかとなったことから、フルボキサミンの抗うつ効果にsigma-1受容体が部分的な役割を担っていることが示唆された。さらに、sigma-1受容体がうつ病をはじめとする精神疾患症状の発現および治療の根底にある機序に関わっている可能性が強く示唆された。また、ステロイド誘発性神経突起伸展抑制作用はうつ病態の*in vitro*モデルとして、sigma-1受容体アゴニスト作用を有する抗うつ薬のスクリーニングに有用であると考えられる。sigma-1受容体アンタゴニストであるNE-100は、統合失調症のモデルとして使用されているPCPモデルにおいて、PCP誘発異常行動改善作用および認知障害改善作用が報告されている[80,83]。このことから、本実験系においてsigma-1受容体に対してインバースアゴニスト様作用を示したセルトラリンは、抗うつ薬としてだけでなく、統合失調症治療薬としての役割も果たせる可能性が考えられる。さらに、今回用いたPC12細胞におけるNGF神経突起伸展評価系は、sigma-1受容体インバースアゴニストのスクリーニングにも有用であると考えられる。今後、セルトラリンの臨床応用にあたり、sigma-1受容体を介した本実験系に対する作用機序の詳細を明らかにすることで、SSRIsの治療疾患の拡大や有効な症状のさらなる抽出が可能になると考えられる。



**Fig.29 Proposed schema of the signaling pathways via sigma-1 receptor of NGF-induced neurite outgrowth.**

## 〔参考文献〕

1. 気分障害の治療ガイドライン作成委員会日本うつ病学会. 日本うつ病学会治療ガイドライン. II. うつ病 (DSM-5) / 大うつ病性障害 2016. 日本うつ病学会治療ガイドライン. 2016.
2. 内閣府. 平成29年 年齢階級別 原因・動機別自殺者数. 2017.
3. Palazidou E. The neurobiology of depression. *Br Med Bull.* 2012;101: 127–145.
4. Freis ED. Mental depression in hypertensive patients treated for long periods with large doses of reserpine. *N Engl J Med.* 1954;251: 1006–1008.
5. Slattery D, Hudson A, Nutt D. Invited review: the evolution of antidepressant mechanisms. *Fundam Clin Pharmacol.* 2004;18: 1–21.
6. Kuhn R. The treatment of depressive states with G 22355 (imipramine hydrochloride). *Am J Psychiatry.* 1958;115: 459–464.
7. Latendresse G, Elmore C, Deneris A. Selective serotonin reuptake inhibitors as first-line antidepressant therapy for perinatal depression. *J Midwifery Women's Heal.* 2017;62: 317–328.
8. Koenig AM, Thase ME. First-line pharmacotherapies for depression-What is the best choice? *Pol Arch Med Wewn.* 2009;119: 478–486.
9. Hyttel J. Pharmacological characterization of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs). *Int Clin Psychopharmacol.* 1994;1: 19–26.
10. Sangkuhl K, Klein T, Altman R. Selective serotonin reuptake inhibitors (SSRI) pathway. *Pharmacogenet Genomics.* 2009;19: 907–909.
11. Zhou Z, Zhen J, Karpowich NK, Law CJ, Maarten EA, Wang D. Antidepressant specificity of serotonin transporter suggested by three LeuT-SSRI structures. *Nat Struct Mol Biol.* 2009;16: 652–657.
12. Wong M-L, Licinio J. Research and treatment approaches to depression.



- Nat Rev Neurosci. 2001;2: 343–351.
13. Mike B, Chantal M. Neurobiological mechanisms involved in antidepressant therapies. *Clin Neuropharmacol.* 1993;16: 387–400.
  14. Gilbert P, Martin W. The effects of morphine and nalorphine-like drugs in the nondependent, morphine-dependent and cyclazocine-dependent chronic spinal dog. *J Pharmacol Exp Ther.* 1976;197: 517–32.
  15. Palacios G, Muro A, Vela JM, Molina-Holgado E, Guitart X, Ovalle S, et al. Immunohistochemical localization of the sigma1-receptor in oligodendrocytes in the rat central nervous system. *Brain Res.* 2003;961: 92–9.
  16. Hayashi T, Su TP. Sigma-1 receptor chaperones at the ER- mitochondrion interface regulate Ca<sup>2+</sup> signaling and cell survival. *Cell.* 2007;131: 596–610.
  17. Narita N, Hashimoto K, Tomitaka S, Minabe Y. Interactions of selective serotonin reuptake inhibitors with subtypes of sigma receptors in rat brain. *Eur J Pharmacol.* 1996;307: 117–9.
  18. Matsumoto RR, Pouw B. Correlation between neuroleptic binding to  $\sigma_1$  and  $\sigma_2$  receptors and acute dystonic reactions. *Eur J Pharmacol.* 2000;401: 155–160.
  19. Chevallier N, Keller E, Maurice T. Behavioural phenotyping of knockout mice for the sigma-1 ( $\sigma_1$ ) chaperone protein revealed gender-related anxiety, depressive-like and memory alterations. *Journal of Psychopharmacology.* 2011. pp. 960–975.
  20. Banister SD, Kassiou M. The therapeutic potential of sigma ( $\sigma$ ) receptors for the treatment of central nervous system diseases : evaluation of the evidence. *Curr Pharm Des.* 2012;18: 884–901.
  21. Fukunaga K, Moriguchi S. Stimulation of the sigma-1 receptor and the effects on neurogenesis and depressive behaviors in mice. *Adv Exp Med Biol.* 2017;964: 201–211.

22. Skuza G, Rogó Z. Antidepressant-like effect of combined treatment with selective  $\sigma$  receptor agonists and a 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist in the forced swimming test in rats. *Pharmacol reports*. 2007;59: 773–777.
23. Hayashi T, Su T-P. Sigma-1 receptor ligands: potential in the treatment of neuropsychiatric disorders. *CNS Drugs*. 2004;18: 269–84.
24. Kimura Y, Fujita Y, Shibata K, Mori M, Yamashita T. Sigma-1 receptor enhances neurite elongation of cerebellar granule neurons via TrkB signaling. *PLoS One*. 2013;8: e75760.
25. Takebayashi M, Hayashi T, Su T-P. Nerve growth factor-induced neurite sprouting in PC12 cells involves  $\sigma$ -1 receptors : implications for antidepressants. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002;303: 1227–1237.
26. Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM. Neurobiology of depression. *Neuron*. 2002;34: 13–25.
27. Terada K, Kojima Y, Watanabe T, Izumo N, Chiba K, Karube Y. Inhibition of nerve growth factor-induced neurite outgrowth from PC12 cells by dexamethasone: Signaling pathways through the glucocorticoid receptor and phosphorylated Akt and ERK1/2. *PLoS One*. 2014;9: e93223.
28. Licznarski P, Duman RS. Remodeling of axo-spinous synapses in the pathophysiology and treatment of depression. *Neuroscience*. 2013;251: 33–50.
29. Karege F, Bondolfi G, Gervasoni N, Schwald M, Aubry J-M, Bertschy G. Low brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in serum of depressed patients probably results from lowered platelet BDNF release unrelated to platelet reactivity. *Biol Psychiatry*. 2005;57: 1068–1072.
30. Shimizu E, Hashimoto K, Okamura N, Koike K, Komatsu N, Kumakiri C, et al. Alterations of serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients with or without antidepressants. *Biol Psychiatry*. 2003;54: 70–75.
31. Henderson CE. Role of neurotrophic factors in neuronal development.

- Curr Opin Neurobiol. 1996;6: 64–70.
32. Lewin GR, Barde YA. Physiology of the Neurotrophins. *Annu Rev Neurosci.* 1996;19: 289–317.
  33. Shen L, Figurov A, Lu B. Recent progress in studies of neurotrophic factors and their clinical implications. *J Mol Med.* 1997;75: 637–644.
  34. McAllister AK, Katz LC, Lo DC. Neurotrophins and synaptic plasticity. *Curr Top Behav Neurosci.* 2013;22: 295–318.
  35. Thoenen H. Neurotrophins and activity-dependent plasticity. *Prog Brain Res.* 2000;128: 183–191.
  36. Poo M ming. Neurotrophins as synaptic modulators. *Nat Rev Neurosci.* 2001;2: 24–32.
  37. Angeletti RH, Bradshaw RA. Nerve growth factor from mouse submaxillary gland: amino acid sequence. *Proc Natl Acad Sci.* 1971;68: 2417–2420.
  38. Angeletti RH, Bradshaw RA, Wade RD. Subunit structure and amino acid composition of mouse submaxillary gland nerve growth factor. *Biochem.* 1971;10: 463–469.
  39. Chao M V., Hempstead BL. p75 and Trk: A two-receptor system. *Trends Neurosci.* 1995;18: 321–326.
  40. Burnham P, Raiborn C, Varon S. Replacement of nerve-growth factor by ganglionic non-neuronal cells for the survival in vitro of dissociated ganglionic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1972;69: 3556–3560.
  41. Thoenen H, Barde YA. Physiology of nerve growth factor. *Physiol Rev.* 1980;60: 1284–1335.
  42. Greene LA, Tischlert AS, Kuffler SW. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor (sympathetic neurons/cell culture/catecholamines/differentiation/neurites). *Cell Biol.* 1976;73: 2424–2428.

43. Nishina A, Kimura H, Tsukagoshi H, Kozawa K, Koketsu M, Ninomiya M, et al. Neurite outgrowth in PC12 cells stimulated by components from *dendranthema × grandiflorum* cv. “mottenohoka” is enhanced by suppressing phosphorylation of p38MAPK. *Evidence-based Complement Altern Med.* 2013;2013: 1–10.
44. Radio NM, Mundy WR. Developmental neurotoxicity testing in vitro: Models for assessing chemical effects on neurite outgrowth. *Neurotoxicology.* 2008;29: 361–376.
45. Ishima T, Fujita Y, Hashimoto K. Interaction of new antidepressants with sigma-1 receptor chaperones and their potentiation of neurite outgrowth in PC12 cells. *Eur J Pharmacol.* 2014;727: 167–173.
46. Nishimura T, Ishima T, Iyo M, Hashimoto K. Potentiation of nerve growth factor-induced neurite outgrowth by fluvoxamine: Role of sigma-1 receptors, IP3 receptors and cellular signaling pathways. *PLoS One.* 2008;3: e2558.
47. Chen S, Xuan J, Couch L, Iyer A, Wu Y, Li QZ, et al. Sertraline induces endoplasmic reticulum stress in hepatic cells. *Toxicology.* 2014;322: 78–88.
48. Irit G-A, Amichai Z, Liat L, Michal T, Meital B, Drorit L, et al. Evaluation of the potential anti-cancer activity of the antidepressant sertraline in human colon cancer cell lines and in colorectal cancer-xenografted mice. *Int J Oncol.* 2008;2: 277–286.
49. Kuwahara J, Yamada T, Egashira N, Ueda M, Zukeyama N. Comparison of the anti-tumor effects of selective serotonin reuptake inhibitors as well as serotonin and norepinephrine reuptake inhibitors in human hepatocellular carcinoma cells. 2015;38: 1410–1414.
50. Vaupel DB. Naltrexone fails to antagonize the sigma effects of PCP and SKF 10,047 in the dog. *Eur J Pharmacol.* 1983;92: 269–274.
51. Seth P, Ganapathy ME, Conway SJ, Bridges CD, Smith SB, Casellas P, et

- al. Expression pattern of the type 1 sigma receptor in the brain and identity of critical anionic amino acid residues in the ligand-binding domain of the receptor. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2001;1540: 59–67.
52. Kekuda R, Prasad PD, Fei YJ, Leibach FH, Ganapathy V. Cloning and functional expression of the human type 1 sigma receptor (hSigmaR1). *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;229: 553–558.
53. Hanner M, Moebius FF, Flandorfer A, Knaus HG, Striessnig J, Kempner E, et al. Purification, molecular cloning, and expression of the mammalian sigma1-binding site. *Proc Natl Acad Sci.* 1996;93: 8072–8077.
54. Pan Y, Mei J, Xu J, Wan B, Zuckerman A, Pasternak G. Cloning and characterization of a mouse sigma1 receptor. *J Neurochem.* 1998;70: 2279–2285.
55. Rossi D, Pedrali A, Urbano M, Gaggeri R, Serra M, Fernández L, et al. Identification of a potent and selective  $\sigma_1$  receptor agonist potentiating NGF-induced neurite outgrowth in PC12 cells. *Bioorg Med Chem.* 2011;19: 6210–6224.
56. Sugimoto Y, Tagawa N, Kobayashi Y, Mitsui-Saito K, Hotta Y, Yamada J. Involvement of the sigma1 receptor in the antidepressant-like effects of fluvoxamine in the forced swimming test in comparison with the effects elicited by paroxetine. *Eur J Pharmacol.* 2012;696: 96–100.
57. Furuse T, Hashimoto K. Fluvoxamine monotherapy for psychotic depression: The potential role of sigma-1 receptors. *Ann Gen Psychiatry.* 2009;8: 6–8.
58. Lambert DG. Drugs and receptors. *Contin Educ Anaesthesia, Crit Care Pain.* 2004;4: 181–184.
59. Sato J, Makita N, Iiri T. Inverse agonism: the classic concept of GPCRs revisited. *Endocr J.* 2016;63: 507–514.
60. Wu Z, Bowen WD. Role of sigma-1 receptor C-terminal segment in

- inositol 1,4,5-trisphosphate receptor activation: Constitutive enhancement of calcium signaling in MCF-7 tumor cells. *J Biol Chem.* 2008;283: 28198–28215.
61. Dinan TG. Glucocorticoids and the genesis of depressive illness. A psychobiological model. *Br J Psychiatry.* 1994;164: 365–371.
  62. McEwen BS. Glucocorticoids, depression, and mood disorders: structural remodeling in the brain. *Metabolism.* 2005;54: 20–23.
  63. Sapolsky RM. Glucocorticoids and hippocampal atrophy in neuropsychiatric disorders. *Arch Gen Psychiatry.* 2000;57: 925–935.
  64. Holsboer F, Lauer CJ, Schreiber W, Krieg J-C. Altered hypothalamic-pituitary-adrenocortical regulation in healthy subjects at high familial risk for affective disorders. *Neuroendocrinology.* 1995;62: 340–347.
  65. Liu HH, Payne HR, Wang B, Brady ST. Gender differences in response of hippocampus to chronic glucocorticoid stress: Role of glutamate receptors. *J Neurosci Res.* 2006;83: 775–786.
  66. Sousa N, Lukoyanov N, Madeira M, Almeida O, Paula-Barbosa M. Reorganization of the morphology of hippocampal neurites and synapses after stress-induced damage correlates with behavioral improvement. *Neuroscience.* 2000;97: 253–266.
  67. Wolkowitz O. Prospective controlled studies of the behavioral and biological effects of exogenous corticosteroids. 1994;19: 233–255.
  68. Kunugi H, Ida I, Owashi T, Kimura M, Inoue Y, Nakagawa S, et al. Assessment of the dexamethasone/CRH test as a state-dependent marker for hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis abnormalities in major depressive episode: A multicenter study. *Neuropsychopharmacology.* 2005;31: 212–220.
  69. Wróbel A, Serefko A, Wlaź P, Poleszak E. The depressogenic-like effect of acute and chronic treatment with dexamethasone and its influence on

- the activity of antidepressant drugs in the forced swim test in adult mice. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry*. 2014;54: 243–248.
70. Bouquet C, Nothias F. Molecular mechanisms of axonal growth. *Adv Exp Med Biol*. 2007;621: 1–16.
  71. Hafner A, Obermajer N, Kos J.  $\gamma$ -Enolase C-terminal peptide promotes cell survival and neurite outgrowth by activation of the PI3K/Akt and MAPK/ERK signalling pathways. *Biochem J*. 2012;443: 439–450.
  72. Read DE, Gorman AM. Involvement of Akt in neurite outgrowth. *Cell Mol Life Sci*. 2009;66: 2975–2984.
  73. Zhao J, Cheng YY, Fan W, Yang C Bin, Ye SF, Cui W, et al. Botanical drug puerarin coordinates with nerve growth factor in the regulation of neuronal survival and neuritogenesis via activating ERK1/2 and PI3K/Akt signaling pathways in the neurite extension process. *CNS Neurosci Ther*. 2015;21: 61–70.
  74. Moriguchi S, Sakagami H, Yabuki Y, Sasaki Y, Izumi H, Zhang C, et al. Stimulation of sigma-1 receptor ameliorates depressive-like behaviors in CaMKIV null mice. *Mol Neurobiol*. 2015;52: 1210–1222.
  75. Hindmarch I, Hashimoto K. Cognition and depression: The effects of fluvoxamine, a sigma-1 receptor agonist, reconsidered. *Hum Psychopharmacol*. 2010;25: 193–200.
  76. Ishikawa M, Hashimoto K. The role of sigma-1 receptors in the pathophysiology of neuropsychiatric diseases. *J Receptor Ligand Channel Res*. 2010;3: 25–36.
  77. Maurice T, Su T-P. The pharmacology of sigma-1 receptors. *Pharmacol Ther*. 2009;124: 195–206.
  78. Budziszewska B, Jaworska-Feil L, Kajta M, Lasoń W. Antidepressant drugs inhibit glucocorticoid receptor-mediated gene transcription-A possible mechanism. *Br J Pharmacol*. 2000;130: 1385–1393.
  79. Pearson Murphy BE. Antigluocorticoid therapies in major depression: A

- review. *Psychoneuroendocrinology*. 1997;22: 125–132.
80. Okuyama S, Nakazato A. NE-100: A novel sigma receptor antagonist. *CNS Drug Rev*. 1996;2: 226–237.
  81. Kishimoto A, Todani A, Miura J, Kitagaki T, Hashimoto K. The opposite effects of fluvoxamine and sertraline in the treatment of psychotic major depression: a case report. *Ann Gen Psychiatry*. 2010;9: 23.
  82. Stephen M. Stahl, M.D. PD. Using secondary binding properties to select a not so selective serotonin reuptake inhibitor. *J Clin Psychiatry*. 1998; 642–643.
  83. Okuyama S, Ogawa S, Nakazato A, Tomizawa K. Effect of NE-100, a novel sigma receptor ligand, on phencyclidine- induced delayed cognitive dysfunction in rats. *Neurosci Lett*. 1995;189: 60–62.



## 〔学会発表〕

1. 松嶋ゆかり、寺田一樹、高田二郎、加留部善晴、和久田浩一、亀井千晃、杉本由美, 選択的セロトニン再取り込み阻害薬セルトラリンの PC12 細胞における NGF 誘発性神経突起伸展作用に対する影響, 第 90 回日本薬理学会年会, 3 月, 長崎 (2017)
2. 松嶋ゆかり、寺田一樹、亀井千晃、杉本由美, セルトラリンの PC12 細胞における NGF 誘発性神経突起伸展に対する抑制作用について, 第 56 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会, 10 月, 徳島 (2017)
3. 松嶋ゆかり、寺田一樹、亀井千晃、杉本由美, 選択的セロトニン再取り込み阻害薬セルトラリンの作用と sigma-1 受容体との関連, 第 133 回日本薬理学会近畿部会, 6 月, 広島 (2018)
4. 松嶋ゆかり、亀井千晃、榊原巖、杉本由美, PC12 細胞を用いた SSRI の活性比較-Sigma-1 受容体に関わる作用について-, 第 20 回応用薬理シンポジウム, 8 月, 東京 (2018)

〔発表論文〕

1. Matsushima Y, Terada K, Takata J, Karube Y, Kamei C, Sugimoto Y. Effects of fluvoxamine on nerve growth factor-induced neurite outgrowth inhibition by dexamethasone in PC12 cells. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2018; 83(4): 659-665
2. Matsushima Y, Terada K, Kamei C, Sugimoto Y. Sertraline inhibits nerve growth factor-induced neurite outgrowth in pC12 cells via a mechanism involving the sigma-1 receptor. *Eur J Pharmacol.* 2019; 853: 129-135

## 〔謝辞〕

本研究に際し、終始御懇篤な御指導と御鞭撻を賜りました指導教授である安田女子大学大学院薬学専攻薬理学分野 亀井千晃教授ならびに副指導教授である大塚英昭教授に心から深謝申し上げます。

本論文を御校閲下さり、多大な御指導と御助言を賜りました安田女子大学大学院 中西 博教授、徳村 彰教授ならびに森本金次郎教授に厚く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、多大な御指導と御協力を賜りました姫路獨協大学薬学部 杉本由美教授に厚く御礼申し上げます。

安田女子大学大学院薬学専攻薬学研究科への進学を熱心に勧めて下さり、本研究を遂行するにあたり、多大なご協力を賜りました福岡大学薬学部 寺田一樹先生に心から感謝の意を表します。学生時代より実験の基礎から研究の面白さに至るまであらゆることを教えて頂きました。今後も教えて頂いた事を忘れず、真摯に研究・教育に努めて参ります。

本研究に際し、御協力を賜りました日本シグマックス株式会社 渡邊孝幸 氏、横浜薬科大学薬学部漢方天然物化学研究室 榊原巖教授をはじめとする漢方天然物化学研究室内の皆様、横浜薬科大学薬学部臨床薬理学研究室 千葉浩司教授、横浜薬科大学学部生同期である廣瀬瑞穂 氏、横浜薬科大学薬学教育センターの皆様深く感謝致します。

本研究に際し、安田女子大学大学院薬学専攻薬学研究科への入学を許可して頂きました瀬山敏雄学長に深甚なる謝意を表します。

最後に温かく見守り続けてくれた家族に感謝致します。