HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	抗うつ薬、ノルアドレナリン、セロトニンが成体海馬歯状回由来神経前駆細胞へ及ぼす影響についての研究
Author(s)	増田, 孝裕
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第9863号
Issue Date	2011-03-24
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k9863
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/52986
Type	doctoral thesis
File Information	masuda20110324.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文

抗うつ薬、ノルアドレナリン、セロトニンが成体海馬歯状回由来神経前駆細胞へ及ぼす影響についての研究

２０１１年３月

北　海　道　大　学

増田　孝裕

目次

発表論文目録および学会発表目録‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥1 頁

緒言‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Takahiro Masuda, Shin Nakagawa, Shuken Boku, Hiroyuki Nishikawa, Naoki Takamura, Akiko Kato, Takeshi Inoue, Tsukasa Koyama

Noradrenaline, but not serotonin or antidepressant drugs, increases neural precursor cells derived from adult rat dentate gyrus through beta2 receptor

The International Journal of Neuropsychopharmacology（投稿中）

2. 増田 孝裕、中川 伸、小山 司

うつ病と海馬神経新生

日本薬理学雑誌, 136 巻 141-144 （2010）

3. Shuken Boku, Shin Nakagawa, Takahiro Masuda, Hiroyuki Nishikawa, Akiko Kato, Yuji Kitaichi, Takeshi Inoue, Tsukasa Koyama

Glucocorticoids and Lithium Reciprocally Regulate the Proliferation of Adult Dentate Gyrus-Derived Neural Precursor Cells through GSK-3β and β-Catenin/TCF Pathway

Neuropsychopharmacology 34, 805–815（2009）

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. Takahiro Masuda, Shin Nakagawa, Shuken Boku, Hiroyuki Nishikawa, Akiko Kato, Takeshi Inoue, Tsukasa Koyama

Noradrenaline, but not serotonin or antidepressants, promotes proliferation of adult rat dentate gyrus derived neural precursor cells.

The 38th annual meeting of the Society for Neuroscience（2008.11.15-19, Washington DC, USA）

2. 増田孝裕、中川伸、朴秀賢、加藤亜紀子、井上猛、小山司

抗うつ薬、ノルアドレナリン、セロトニンが成体ラット海馬歯状回由来神経幹・前駆細胞の増殖に及ぼす影響

第 31 回日本生物学的精神医学会（2009.4.23-25, 京都）

3. 増田孝裕、中川伸、小山司

うつ病と海馬神経新生 （シンポジウム）

第 83 回日本薬理学会年会 （2010.3.16-18, 大阪）

緒言

うつ病とは、様々な精神症状（抑うつ気分、興味・関心の減退、意欲・気力の減退、思考力の低下など)、身体症状（睡眠障害、食欲変化、体重変化など）が 2 週間以上にわたり継続して現れる病気であり、その生涯罹患率は 10%を超えるとも言われ、決して珍しい病気ではない (Kessler et al., 2003)。また、わが国の年間自殺者数は平成 10 年以降 12 年連続で 3 万人を超えており、うつ病はその主因と考えられていることから、自殺予防対策としても、うつ病治療は非常に重要である。

現在、うつ病の治療はセロトニン (5-hydroxytryptamine, 5-HT) やノルアドレナリン (noradrenaline, NA) といったモノアミンを増加させる薬剤による薬物療法が中心となっており、選択的 5-HT 再取り込み阻害薬 (selective serotonin reuptake inhibitor, SSRI)、5-HT/NA 再取り込み阻害薬などの抗うつ薬が頻用されている。これら抗うつ薬は投与してから数時間以内に脳内の細胞外モノアミン濃度を増加させることが動物実験で示されているが (Fuller, 1994; Kreiss and Lucki, 1995; Sacchetti et al., 1999) 、臨床での治療効果発現までには数週間の慢性投与が必要となる (Blier et al., 1994)。これまでに、この抗うつ薬の作用発現時間の乖離を説明するために、抗うつ薬を動物に慢性投与することによって認められる現象から様々な検討がなされてきた。古くは脳内の 5-HT_{2A} 受容体、β受容体の受容体数減少仮説があるが、比較的新しい抗うつ薬である SSRI の慢性投与では上記受容体数の減少は認められなかった (Moresco et al., 2000; Pälvimäki et al., 1994)。その後、抗うつ薬の慢性投与により、受容体の細胞内情報伝達系である cAMP 量が増加することや、その下流の転写因子である cAMP response element binding protein (CREB) が活性化されること(Thome et al., 2000)、また脳由来神経栄養因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) などのたんぱく質が発現誘導されることが報告されている (Warner-Schmidt and Duman, 2006)。また、cAMP を増加させる phosphodiesterase 4 阻害剤である rolipram あるいは BDNF、VEGF を動物に投与することにより抗うつ薬様作用が報告されていることから (Shiralyama et al., 2002; Warner-Schmidt and Duman, 2007; Zhang et al., 2002)、cAMP の増加から始まる一連の現象が抗うつ作用発現に関与する可能性が示唆されている。しかしながら、これらの現象により、脳内でどのような変化が起きて、うつ病の治療効果発現に結びついているのか未だ充分に説明がなされていない。

そうした中、抗うつ薬の作用メカニズムの新しい仮説として海馬神経新

生促進仮説が提唱され (Dranovsky and Hen, 2006; Duman et al., 2001; Warner-Schmidt and Duman, 2006)、注目を集めている。これまでは、神経細胞は胎生期、幼若期において新生され、成熟期には新たに生じないという考え方が主流であった。しかし近年、海馬歯状回などの特定の脳領域においては、成熟期においても神経幹・前駆細胞が存在し、それらが増殖、分化することにより神経細胞が新生されることが明らかにされている (Gage et al., 2000)。この海馬歯状回の神経幹・前駆細胞は、ラット・サルといった動物だけでなくヒトにおいても存在が確認されている (Eriksson et al., 1998)。

ストレスはうつ病発症の危険因子と考えられているが (Gold et al., 2002)、物理的・精神的ストレスを負荷することによって海馬歯状回の神経幹・前駆細胞の増殖は抑制される (Gould et al., 1997; Pham et al., 2003)。逆に、臨床における抗うつ薬によるうつ病の症状改善の時間経過と類似して、SSRI などの種々の抗うつ薬を動物に慢性投与すると海馬歯状回の神経幹・前駆細胞の増殖が促進される (Airan et al., 2007; Malberg et al., 2000; Santarelli et al., 2003)。さらには放射線照射などによって海馬神経新生を阻害した動物を用いると抗うつ薬による抗うつ様作用が消失することなどが報告されていることから (Airan et al., 2007; Santarelli et al., 2003)、抗うつ薬の治療メカニズムに成体における海馬神経新生促進作用が関与していることが示唆されている。

抗うつ薬が海馬神経新生を増やすメカニズムについては、これまで充分には明らかになっていない。抗うつ薬は海馬においても細胞外 NA や 5-HT 濃度を増やす (Kreiss and Lucki, 1995; Sacchetti et al., 1999)。また、NA 神経、5-HT 神経を破壊すると海馬における神経幹・前駆細胞の数が減少する (Brezun and Daszuta 1999; Kulkarni et al., 2002)、すなわち NA、5-HT が海馬神経新生を促進する方向で制御していることから抗うつ薬はモノアミン増加を介して海馬神経新生を増加させていることが考えられている。抗うつ薬の慢性投与により海馬で CREB のリン酸化が増えるが、この CREB リン酸化は海馬神経幹・前駆細胞では認められず、周辺の成熟細胞において確認されている (Nakagawa et al., 2002)。さらには CREB 結合サイトをプロモーター領域に含む VEGF や BDNF といったたんぱく質が海馬で二次的に発現誘導され、VEGF は神経幹・前駆細胞の増殖作用に、BDNF は神経幹・前駆細胞の神経への分化や生存に影響を与えるとされている (Warner-Schmidt and Duman, 2006)。以上のことから、現在、図 1 に示すような成熟細胞の細胞内情報伝達経路の活性化を中心としたメカニズムが推定されている。

一方で、神経幹・前駆細胞に対して抗うつ薬、モノアミンが直接的にど

のような作用を及ぼすかについてはほとんど明らかになっていない。その要因の一つとして、成体由来の特に海馬歯状回の神経幹・前駆細胞の培養が難しいことが挙げられる。実際、成体海馬歯状回由来の神経幹・前駆細胞の培養についての論文報告は数少なく (Babu et al., 2007)、その方法が充分に確立されているとは言い難い。そうした中、我々は成体ラット海馬歯状回由来の神経前駆細胞 (Adult rat Dentate gyrus-derived neural Precursor cell, ADP) の培養系を確立することに成功した (Boku et al., 2009)。

抗うつ薬、モノアミンの神経幹・前駆細胞に対する直接作用を検討することは、抗うつ薬の海馬神経新生促進作用のメカニズム解明につながる可能性があり、また新たな抗うつ薬創製の糸口になることが期待される。そこで本研究では、4 種の抗うつ薬（5-HT 再取り込み阻害薬 fluoxetine、三環系抗うつ薬 imipramine、NA 再取り込み阻害薬 reboxetine、モノアミン酸化酵素阻害薬 tranylcypromine)及び NA、5-HT が ADP の増殖、分化、アポトーシスに及ぼす影響について検討した。その結果、抗うつ薬、5-HT は ADP の増殖、分化、アポトーシスのいずれに対しても影響を及ぼさなかった。一方、NA は ADP の分化、アポトーシスには影響を及ぼさなかったが、ADP の増殖を促進することが明らかとなった。また、この NA の ADP 増殖促進作用は β_2 アドレナリンレセプター (Adrenergic Receptor, AR) 刺激を介していることを見出すことができた。

海馬歯状回における神経幹・前駆細胞は、形態、特異的マーカーの発現、増殖能などの特徴から現在 4 つのステージに分類されているが (Kempermann et al., 2004)、ADP はその特徴から type-2a cell に近い early progenitor cell に相当すると考えられた(Boku et al., 2009)。従って、抗うつ薬は、脳内 NA 濃度を増加させ、海馬歯状回の early progenitor cells 上の β_2-AR を刺激して early progenitor cells を増殖促進させることによって海馬神経新生を促進させている可能性が示唆された。

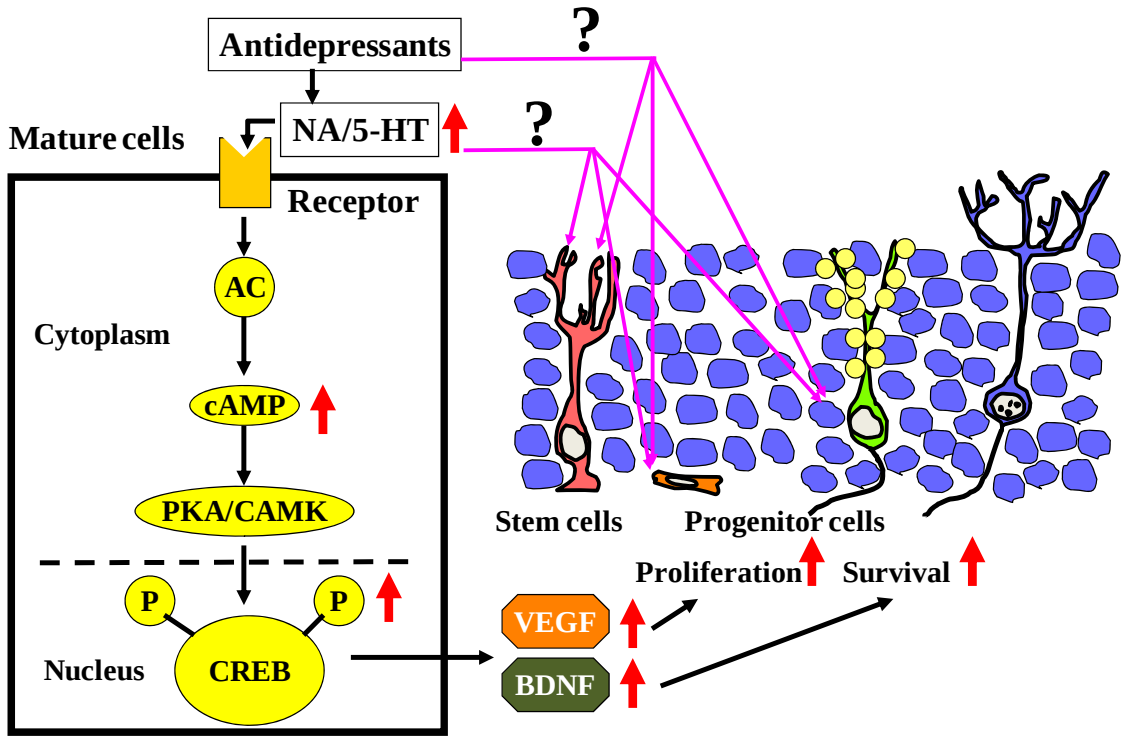


図 1. 抗うつ薬による海馬神経新生促進作用の推定されているメカニズム

海馬歯状回では、神経幹・前駆細胞が増殖、分化することにより神経細胞が新生される。これまでに、抗うつ薬はモノアミン (NA, 5-HT) を増加させ、成熟細胞の細胞内情報伝達経路を活性化し、二次的に蛋白質 (BDNF, VEGF)を発現誘導することにより神経新生を促進することが推定されている。一方で、抗うつ薬やモノアミンの神経幹・前駆細胞に対する直接的な作用は明らかとなっていない。AC：アデニル酸シクラーゼ、PKA：プロテインキナーゼ A、CAMK：カルモジュリンキナーゼ

略語表

本文中および図中に使用した略語は以下のとおりである。

ADP	adult rat dentate gyrus-derived neural precursor cell
AR	adrenergic receptor
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
bFGF	basic fibroblast growth factor
BrdU	5-bromo-2-deoxyuridine
CREB	cAMP response element binding protein
DCX	doublecortin
FBS	fetal bovine serum
GFAP	glial fibrillary acidic protein
HBSS	hanks balanced salt solution
5-HT	5-hydroxytryptamine
5-HTR	5-HT receptor
NA	noradrenaline
PBS	phosphate-buffered saline
PS	penicillin-streptomycin
SOX2	sex determining region Y-box 2
SSRI	selective serotonin reuptake inhibitor
Tuj-1	βIII-tubulin
VEGF	vascular endothelial growth factor

実験方法

1．薬物

Serotonin creatinine sulfate complex、fluoxetine hydrochloride、imipramine hydrochloride、reboxetine mesylate hydrate、tranylcypromine hydrochloride、phentolamine hydrochloride、prazosin hydrochloride、yohimbine hydrochloride、(±)-propranolol hydrochloride、timolol maleate salt、 (-)-isoproterenol hydrochloride、xamoterol hemifumarate salt はいずれも Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, MO) から購入した。Salmeterol、CGP20712A dihydrochloride、ICI-118551 hydrochloride は Tocris Bioscience (Bristol, UK) から購入し、L-noradrenaline は東京化成工業 (Tokyo, Japan) から購入した。

2．薬物濃度

抗うつ薬のモノアミントランスポーターに対する結合親和性は 0.01 μM 程度であるが (Wong et al., 2000)、臨床における抗うつ薬の有効血中濃度は約 1 μM であることが示されている (DeVane, 1999; Kelly et al., 1989)。また、fluoxetine など一部の抗うつ薬では、脳内における薬剤濃度は血中濃度の 10 倍ほど高いことが報告されている (Karson et al., 1993; Strauss et al., 1997)。従って、今回抗うつ薬の濃度は 0.01 – 10 μM を用いることにした。

正常動物の海馬細胞外液中における NA、5-HT 濃度はそれぞれ約 10 nM、0.3 nM であることがマイクロダイアリシス実験により報告されているが (Abercrombie et al., 1988; Mokler et al., 2007)、脳海馬スライスを用いた電気生理学実験においては NA、5-HT ともにマイクロモーラーオーダーの濃度を用いて研究されている (Krause and Jia, 2005; Muller et al., 1981)。つまりシナプス間隙中のモノアミン濃度は、細胞外液中の濃度に比べ高いことが考えられる。そこでモノアミン濃度は 0.01 – 10 μM を用いることとした。

3. 組織培養

雄性 SD ラット 8 匹（8 - 10 週齢、日本エスエルシー）をネンブタール麻酔下で断頭し、脳を摘出した。氷冷下にて、小脳を取り除いた前脳を脳スライスチャンバー（室町機械、東京）にセットし剃刀で約 1 mm 厚の冠状スライス切片を作製し、実体顕微鏡下、冠状脳切片より海馬歯状回のみを限局して（図 2 の赤枠内）慎重に切り出した。

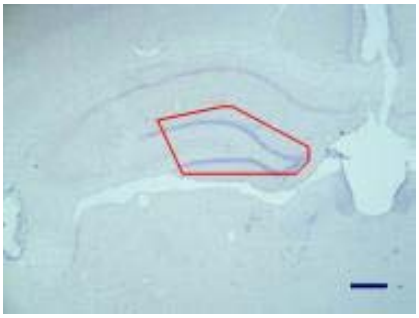
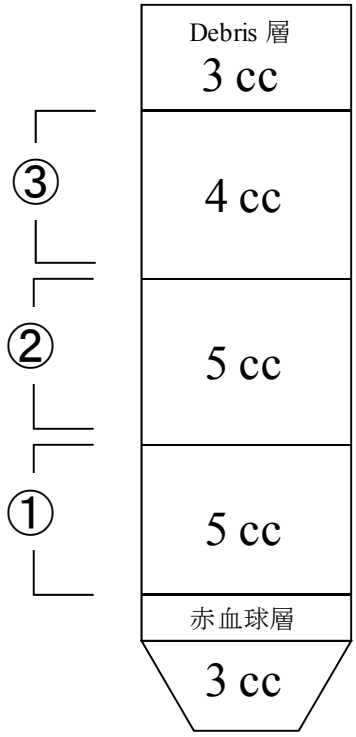


図 2　ラット海馬の明視野写真　 (Scale bar : 500 μm)　枠内の歯状回を顕微鏡下で切り出した。

切り出した歯状回片を氷冷 1% penicillin-streptomycin (PS; Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) 含有 Hanks balanced salt solution (HBSS ; Sigma-Aldrich Corp.) に 8 匹分プールし、氷冷下のシャーレ上にてメスで十分に細切した。細切した組織を 2.5 U/ml Papain (Worthington Biochemical Corp., Lakewood, NJ)、1 U/ml Dispase II (F. Hoffman La Roche Ltd., Indianapolis, IN)、250 U/ml Deoxyribonuclease I (Worthington) からなる 40 ml PPD 溶液にて 37℃、30 分間インキュベート（酵素処理）することによって細胞を単離した。その後、室温で 500g x 5 分間遠心、上清を除去し、氷冷 10% fetal bovine serum (FBS; Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) 含有 DMEM/F12 (Sigma-Aldrich Corp.) 培地で再懸濁後、70 μm ストレイナーを用いてろ過した。ろ液を室温で 500g x 5 分間遠心、上清を除去した後、DMEM/F12/10%FBS による wash 操作を 2 回行った。10 ml の DMEM/F12/10% FBS で再懸濁した液に同量の 100%等張 Percoll 溶液 (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) を加え、室温で 20,000g x 30 分間遠心し、目的各分（図 3 の③層）（約 4 ml）を採取した（図 3 参照）。

その後 15 ml の DMEM/F12/10%FBS を加え懸濁し、室温で 1,000g x 5 分間遠心した。上清除去後、DMEM/F12/10%FBS (10 ml) で wash し、最終的に DMEM/F12/10%FBS/PS (0.25 ml) に懸濁し、uncoated-plastic 48well plate（旭テクノグラス）の 1well に播種し、CO_2 インキュベーター (37℃、5%CO_2) で培養した。翌日、培地を無血清条件の増殖培地である B27 supplement minus vitamin A (Invitrogen Corp.)/2 mM L-Glutamine (Invitrogen Corp.)/1% PS/20 ng/ml basic fibroblast growth factor (bFGF; Invitrogen Corp.) 含有 Neurobasal (Invitrogen Corp.) 培地に置換した。2 - 3 日後に、細胞を trypsin（ナカライ）処理により剥離、phosphate-buffered saline (PBS; Sigma-Aldrich Corp.) で wash 後、上記無血清条件下の増殖培地で再懸濁し、poly L-ornithine (Invitrogen Corp.)- laminin (Invitrogen Corp.) でコーティング処理した plastic 48 well plate の 1 well に再播種した。その後 2 - 3 日に 1 度の割合で、半分量の培地

を新鮮増殖培地に置換（残りの半分量の培地は conditioned medium として使用）した。80 - 90% confluent になった時点で、poly L-ornithine-laminin でコーティング処理した 24 well plate の 1well に再播種した。その後同様にコーティング処理した 12 well plate の 1 well、35 mm dish、60 mm dish、100 mm dish（いずれも旭テクノグラス）に段階的に細胞播種面積を拡大した。その後は、コーティング処理した 100 mm dish を用いて細胞継代を実施した。細胞は、光学顕微鏡 (IX-70; Olympus) を用い観察を行い、画像はデジタルカメラ (DP12; Olympus) を用いて記録した。なお、動物の取り扱いは北海道大学医学部「動物実験に関する指針」に基づき行った。



細胞の単離の際の密度勾配法における採取画分の予備検討結果

【①層】ADP とは異なる小さく丸い米粒状の細胞が多い。

【②層】①層、③層の混在。

【③層】ADP と考えられる細胞が多く存在。

以上の結果から③層を用いることに決定。

図 3　Percoll 溶液を用いた密度勾配の模式図

4．免疫染色

細胞を poly L-ornithine-laminin コーティング処理した 8 well ガラスチャンバースライド (Lab-Tek II; Nalge Nunc International, Naperville, IL) に、1-2×10^4 cells/well の割合で、増殖培地を用いて播種。翌日、培地を除去後、4% Paraformaldehyde/PBS（和光純薬）を添加し、10 分間室温でインキュベートして細胞を固定した。PBS で wash をした後、3% goat or rabbit serum (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA)/0.2% Triton X-100 /PBS で 15 分間室温インキュベートして blocking、透過処理を行った。3% goat or rabbit serum/PBS で希釈した 1 次抗体液（表 1）を用いて 4℃で一晩インキュベートした。PBS で wash した後、PBS で希釈した 2 次抗体液（表 2）で 1 時間室温インキュベートした。PBS で wash した後, スライドは DAPI 入りの Vectashield (Vector Laboratories Inc.) で封入した。倒立蛍光顕微鏡 (IX-71; Olympus) を用い可視化し、染色画像は CCD カメラ (DP30; Olympus) を用いて記録した。

細胞の分化能を調べる実験においては、細胞播種翌日に培地を分化誘導培地に置換した。分化誘導培地は、bFGF フリーの 1 μM all-trans retinoic acid (Sigma-Aldrich Corp.)/0.5% FBS (Invitrogen Corp.) 含有増殖培地を用いた。細胞は分化誘導培地にて 7 日間培養した。その後、上記記載の方法で免疫染色を行った。

5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) 染色においては、細胞播種翌日に 10 μM BrdU (Sigma-Aldrich Corp.) を添加し細胞に取り込ませ、翌日に免疫染色を行った。培地を除去後、細胞を 4% paraformaldehyde/PBS で 10 分間室温処置し、PBS で wash をした後、2N HCl で 30 分間室温処置した。PBS による wash 操作の後、1% H_2O_2/PBS で 5 分間室温処置した。その後、3% horse serum/0.2% Triton X-100 /PBS で 15 分間室温処置して blocking、透過処理を行った。3% horse serum/PBS で希釈した mouse anti-BrdU 抗体を用いて一晩 4℃でインキュベートした。その後、biotin 標識 horse 抗 mouse IgG 抗体で 1 時間室温処置、PBS での wash 後、Abidin Biotin peroxidase complex (Vector Laboratories Inc.) で 1 時間室温処置した。PBS での wash 後、DAB 基質溶液 (Vector Laboratories Inc.) を加え、発色させた。

以下に使用抗体の一覧を記載する。

表 1.　1 次抗体一覧

免疫主	抗原	使用濃度	メーカー
mouse	Nestin	1/2000	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ
mouse	βIII-tubulin　(Tuj-1)	1/5000	Covance Inc., Princeton, NJ
mouse	O4	1/2000	Chemicon International Inc., Temecula, CA
mouse	BrdU	1/50	Becton Dickinson & Co
rabbit	glial fibrillary acidic protein (GFAP)	1/2000	Dako, Glostrup, Denmark
rabbit	sex determining region Y-box 2 (SOX2)	1/2000	Chemicon
rabbit	Prox1	1/2000	Chemicon
guinea pig	GFAP	1/400	北海道大学大学院医学研究科渡辺雅彦先生より供与いただいた
goat	Doublecortin (DCX)	1/100	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA

表 2.　2 次抗体一覧

免疫主	標識	抗原	使用濃度	メーカー
goat	Cy3	mouse IgG	1/200	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA
goat	FITC	rabbit IgG	1/100	Jackson ImmunoResearch
goat	Cy5	guinea pig IgG	1/50	Jackson ImmunoResearch
rabbit	Cy3	goat IgG	1/200	Jackson ImmunoResearch
horse	Biotin	mouse IgG	1/200	Vector Laboratories Inc.

5. 細胞数測定

生細胞数は、簡便で非 RI アッセイである Alamar Blue assay 法にて定量した。Alamar Blue (Biosource International Inc., Camarillo, CA) は、MTT 同様の酸化還元指示薬であり、代謝活性のある細胞によって還元されることから生細胞数の評価に用いられており、MTT に比べ毒性が弱いとされている。

poly L-ornithine-laminin コーティング処理した 96 well プレートに増殖培地を用いて 5000 cells/well (100 µl/well) で播種した。翌日、薬剤処理を行った。薬剤は PBS または DMSO にて溶解し、最終の PBS または DMSO 濃度は増殖培地を用いて 0.5%となるように添加した。3 日間薬剤存在下で細胞を培養した後、10 µl/well の割合で Alamar Blue を添加した。3 時間後にマルチスペクトロマイクロプレートリーダー (Varioskan Flash; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA) を用いて 570 nm、600 nm の 2 波長の吸光度を測定した。Alamar Blue 還元率は、使用説明書の公式に従って算出した。NA の作用に対する拮抗試験は、10 µM の NA 存在下、非存在下で各アンタゴニストを用いて試験を実施した。

予備検討により、ADP 細胞数と Alamar Blue の還元率が相関することは確認した（図 4)。

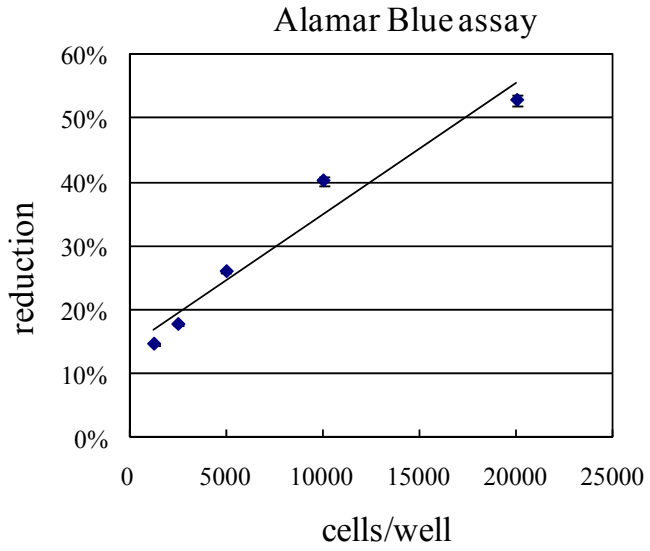


図 4：細胞数と Alamar Blue の還元率の相関

細胞は 96 well プレートに播種し、翌日に Alamar Blue assay を実施した。Alamar Blue 添加 3 時間後に吸光度を測定した。

6. 細胞の DNA 合成測定

DNA 合成の評価は、細胞周期の S 期に取り込まれるチミジンアナログである BrdU の取込みを指標に、市販の ELISA kit (Cell proliferation ELISA, BrdU; Roche) を用いて行った。Alamar Blue assay の時と同様に細胞播種、薬剤添加、3 日間培養後に細胞に BrdU を添加し、37℃で 2 時間インキュベートした後、BrdU 取り込みを ELISA で測定した。

7. レチノイン酸による ADP 分化に対する薬剤評価

poly L-ornithine-laminin コーティング処理した 8 well ガラスチャンバースライドに、細胞を 2×10^4 cells/well の割合で、増殖培地を用いて播種。翌日に培地を分化誘導培地（bFGF フリーの 1 μM all-trans retinoic acid /0.5% FBS 含有増殖培地）に置換すると共に薬剤を添加した。薬剤は PBS または DMSO にて溶解し、最終の PBS または DMSO 濃度は増殖培地を用いて 0.5%となるようにした。7 日間培養した翌日にニューロンのマーカー (Tuj1)、アストロサイトのマーカー(GFAP)を二重免疫染色した。各マーカー陽性細胞数をカウントし、総細胞数（DAPI（核染色）陽性細胞数）に対する陽性率を算出した。1 well の陽性率は 3 視野（30 – 50 cells/視野）の平均を用い、各薬剤処理における数値は 3 回分（3 well 分）の値を平均することによって求めた。

8. スタウロスポリンによる ADP アポトーシス誘導試験

分化誘導の試験と同様に細胞播種。翌日に 300 nM staurosporine 含有の増殖培地に置換すると共に薬剤を添加し、3 日間培養した。アポトーシス誘導された細胞は Dead End Fluorometric TUNEL System (Promega, Madison, WI) を用いて、TUNEL 染色によって検出した。TUNEL 陽性細胞数をカウントし、総細胞数（DAPI（核染色）陽性細胞数）に対する陽性率を算出した。1 well の陽性率は 4 視野（15 – 30 cells/視野）の平均を用い、各薬剤処理における数値は 4 回分（4 well 分）の値を平均することによって求めた。

9. ADP lysate 及び培養上清中の 5-HT、NA 測定

細胞は Alamar Blue assay の時と同様の手順で 1 - 3 日間培養した。各日において培養上清を採取し、等量の 0.2 M 過塩素酸を添加し混和した。培養細胞は 0.1 M 過塩素酸を添加し回収した。各サンプルは 12,000g x 4℃で 30 分間遠心した。上清中のモノアミンは、HPLC を用いて測定した。NA 測定は、EP-300 liquid chromatograph pump (Eicom)、DG-300 degasser (Eicom)、reversed

phase ODS column Eicompak CA-5ODS 150 2.1 mm (Eicom)、ECD-300 electrochemical detector (Eicom)、CTC-100 column oven (Eicom)、PowerChrom (AD Instruments, Sydney, Australia) で構成される HPLC システムを使用し、移動相は 5% (v/v) methanol、50 mg/l Na_2EDTA、500 mg/l L-octanesulfonate 含有の 0.1 M phosphate buffer (pH 6.0) を用い、流速 0.23 ml/min で実施した。5-HT 測定は、NA 測定とほぼ同様であるが、reverse phase ODS column を Eicompak PP-ODS 30 4.6 mm (Eicom) に、移動相を 1% (v/v) methanol, 50 mg/l Na_2EDTA、500 mg/l sodium L-decanesulfonate 含有の 0.1 M phosphate buffer (pH 6.0) に変えて、流速は 0.5 ml/min で実施した。

10. RNA 単離および reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

poly L-ornithine-laminin コーティング処理した 35 mm dish に増殖培地を用いて 100,000 cells/dish で播種した。翌日、RNeasy extraction kit (Qiagen Inc., Hilden, Germany) を用いて total RNA を単離した。260 nm の吸光度を測定することにより核酸量を定量した。Total RNA を Quantitect Reverse Transcription Kit (Qiagen Inc.)を用いて、cDNA に逆転写した。cDNA、SYBR GreenER qPCR SuperMix for ABI Prism (Invitrogen Corp.)、各プライマー（表 3 参照）を下記に示す組成で 96 well plate (MicroAmp optical 96well- Reaction Plate; Applied Biosystems, Foster City, CA) に添加した。

cDNA	1	μL
10 μM primer Forward (final 200nM)	0.5	μL
10 μM primer Reverse (final 200nM)	0.5	μL
dH_2O	10.5	μL
2 x Syber mix	12.5	μL
total	25	μL

PCR は sequence detection system (ABI Prism 7000; Applied Biosystems) を用いて実施した。PCR プロトコルは、50℃ : 2 分、 95℃ : 10 分、その後 40 cycles（95℃ : 15 秒、 60℃ : 1 分）で行った。PCR 反応産物は 6 x loading buffer (Takara) と混和し、エチジウムブロマイド入りの 3%アガロースゲルに添加し、Mupid-a (Advance)を用いて 100 V で 30 – 40 分間、電気泳動した。電気泳動ゲルの写真はイメージ解析装置 (Kodak 1D; Eastman Kodak Company, Rochester, NY) を用いて取得した。

表 3.　RT-PCR に用いたプライマー配列一覧

Primers		Sequences	Products size (bp)
GAPDH	forward	5’-AACTTTGGCATTGTGGAAGGG-3’	260
	reverse	5’-TCATCATACTTGGCAGGTTTCTCC-3’	
α_{1A}-AR	forward	5’-ACCATCTCCCTCGGTGAAA-3’	67
	reverse	5’-TTCTCCCTTTTCCTGTGACC-3’	
α_{1B}-AR	forward	5’-CTGGGCCACTCTTCACCTT-3’	71
	reverse	5’-GTTGCTGGTGTCGCCTTC-3’	
α_{1D}-AR	forward	5’-TCTTCTTCGTCCTGCCTCTG-3’	109
	reverse	5’-AGCGGGTTCACACAGCTATT-3’	
α_{2A}-AR	forward	5’-CAGCCCCTAGCACTCTGAAA-3’	65
	reverse	5’-AGTCCCCTCCAAACTGGGTA-3’	
α_{2B}-AR	forward	5’-CTGATCATCCTGCCTTCACC-3’	61
	reverse	5’-CCAGGTATGGTAGGGATTGTTG-3’	
α_{2C}-AR	forward	5’-GGACTTCAGGGTACAGTGTGG-3’	64
	reverse	5’-CAGAGGCCCAGTTGTCTCTC-3’	
β_1-AR	forward	5’-GGATCGCCTCTTCGTCTTCT-3’	69
	reverse	5’-CAGTAGATGATGGGGTTGAAGG-3’	
β_2-AR	forward	5’-CCTCACTGGTCAAGTATTAAGGATAA-3’	92
	reverse	5’-TCCAAGGGTACAGGAAGAAAAC-3’	
β_3-AR	forward	5’-TGTCTCCAGGTTCTGTGTTCC-3’	61
	reverse	5’-GGGTTTCCTGCTTTCCAAC-3’	
5-HT_{1A}R	forward	5’-GGGCAACTCCAAAGAGCA-3’	62
	reverse	5’-CGGGGGCATAGGAGTTAGAT-3’	
5-HT_{2A}R	forward	5’-TGATGTCACTTGCCATAGCTG-3’	111
	reverse	5’-TCGCACAGAGCTTGCTAGG-3’	
5-HT_{2B}R	forward	5’-TCAACTGATGAGACACTGATGAGA-3’	64
	reverse	5’-AAATGGTCTGGGCTGGTTTT-3’	
5-HT_{2C}R	forward	5’-ATCATGTGGTGCCCGTTT-3’	61
	reverse	5’-TACAGGCCTTCCCACAAAGA-3’	
SERT	forward	5’-TAATCACGCTGGGATTGGAC-3’	113
	reverse	5’-GATGAGCACGAACCATTCC-3’	

NAT	forward	5’-CCCAGAGAGACGTGAGACAGT-3’	87
	reverse	5’-ACATTGGCACGTGGGTTC-3’	

11. データ解析

グラフの結果は全て平均値±平均値の標準誤差で示した。統計解析は、濃度反応実験においては one-way ANOVA で分散分析を行った後、Dunnett’s post hoc test で多重比較を実施した。薬物拮抗実験においては Student’s t-test で解析した。解析には SAS for Windows, Version 5.1.2600 (SAS Institute Inc.) を用いた。$P<0.01$ をもって、統計学的有意差ありと判定した。

実験結果

1. 成体ラット海馬歯状回由来の神経前駆細胞 (Adult rat Dentate gyrus-derived neural Precursor cell、ADP) の培養系の確立

成体海馬歯状回の神経幹・前駆細胞に対する抗うつ薬、モノアミンの直接作用を検討するため、まず成体ラット海馬歯状回由来の神経幹・前駆細胞の培養系の確立を行った。

用いた培養法の特徴は、①胎生期や幼若期でなく成熟期（8 週齢）のラット脳を使用したこと、②海馬全体ではなく歯状回に限局した組織を使用したこと、③神経幹・前駆細胞の培養方法として monolayer 法を用いたことが挙げられる。これまでにも成体ラット海馬由来の神経幹・前駆細胞の培養系の報告はされている (Palmer et al., 1999) が、海馬全体を用いると神経幹・前駆細胞が存在するもうひとつの脳領域である側脳室下帯由来の神経幹・前駆細胞がコンタミする可能性が報告されていること (Seaberg and van der Kooy, 2002) から、海馬歯状回のみを限局して組織を使用した。また、神経幹・前駆細胞の培養法としては、大きく neurosphere 法と monolayer 法があるが、neurosphere 法による培養であると細胞を大量調製しやすいというメリットはあるが、sphere 内部の細胞の形態を顕微鏡観察では確認できない上に sphere の内部の細胞には分化した細胞が多く含まれることや薬剤処置した場合に sphere 内部まで薬剤が浸透しにくい可能性があるという報告がある (kempermann, 2006)。そこで、できるだけ homogeneous な細胞群を獲得するために、顕微鏡観察で細胞の形態、状態を確認しやすい monolayer 法を選択した。

1－1）細胞の取得

先行研究（成体ラット海馬由来の神経幹・前駆細胞）の培養方法 (Palmer et al., 1999) を参考に、Percoll を用いた密度勾配法における採取画分の検討や細胞維持における細胞播種密度に工夫を加えることにより、比較的 homogeneous な細胞群を得ることができた。細胞は、培養開始後 30 日から 50 日程度で 100 mm dish で培養できるまでに増殖した。

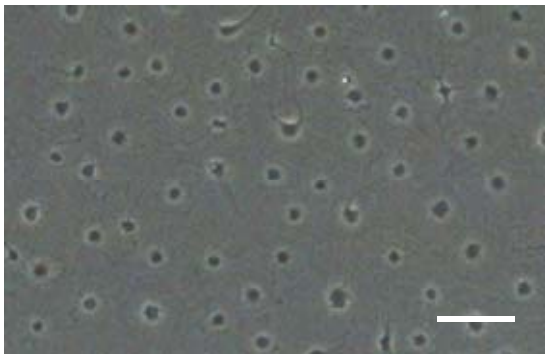
1－2）細胞の特徴づけ

神経幹・前駆細胞の特徴としては「① Nestin, SOX2 といった特異的抗原マーカーが発現していること②自己増殖能を有すること③ニューロンやグリア細胞への分化能を有すること」という３つが挙げられる (kempermann,

2006)。そこで得られた細胞がこれら神経幹・前駆細胞の特徴を有するかどうかについて検討した。

1－2）A　細胞の形態

図 5 に示すように、細胞の形態はフラットで短い突起を有する dark phase の細胞であることが確認された。

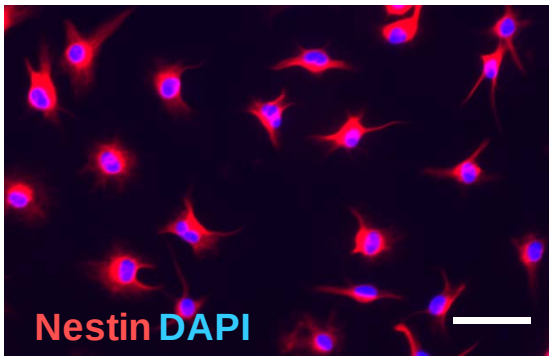


Scale Bar = 45 μm

図 5.　培養開始してから 40 日後の ADP の明視野写真

1－2）B　特異的マーカー発現の検討

神経幹・前駆細胞のマーカーである Nestin の発現を蛍光免疫染色で検出したところ、図 6 に示すように 90%以上の細胞が Nestin 陽性であることが確認された。

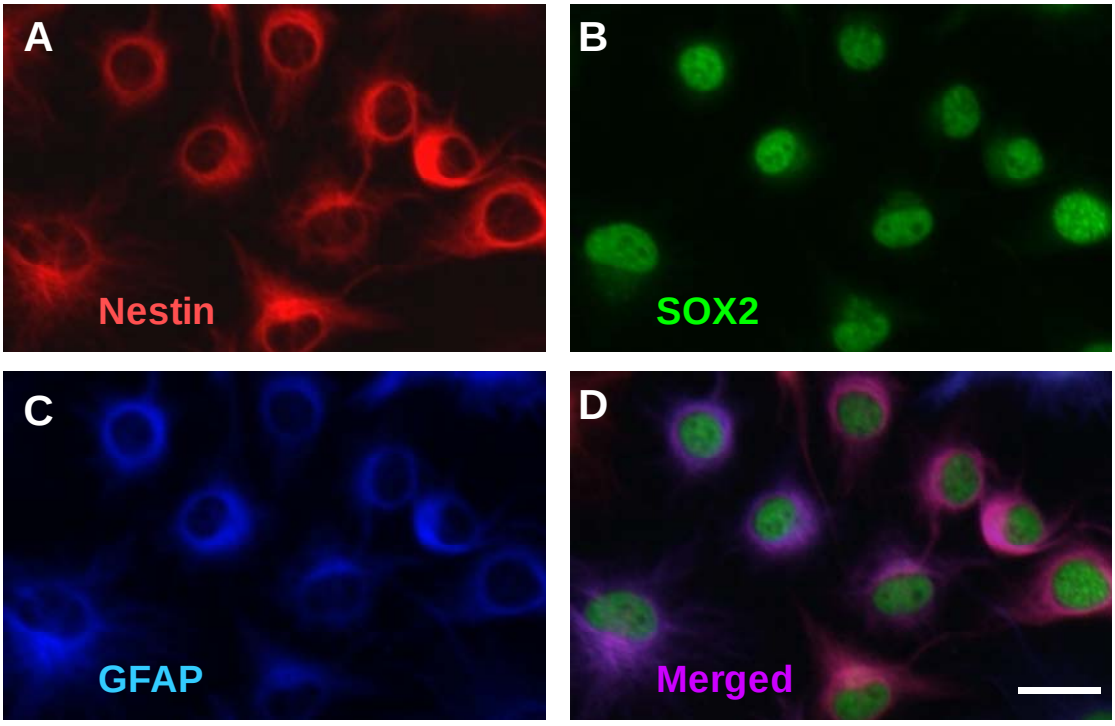


Scale Bar = 70 μm

図 6. 神経幹・前駆細胞のマーカーNestin（赤）、核染色 DAPI（青）の蛍光二重染色像

次に他の神経幹・前駆細胞のマーカーである SOX2, GFAP の発現について検討した。細胞のフィラメント部分に Nestin, GFAP の存在が確認され、転写因子である SOX2 は細胞の核内に確認できた（図 7- A, B, C）。GFAP の

発色の強度は比較的弱いものであった。また三重染色画像を merge することにより、Nestin 陽性細胞は SOX2, GFAP の両マーカーに対しても陽性であることが確認された（図 7D）。一方、immature neuron マーカーの DCX、Prox1 は陰性であった。また、Nestin、SOX2 の陽性率は実験期間中、常に 90%程度であり homogeneous な細胞群であることも確認された。

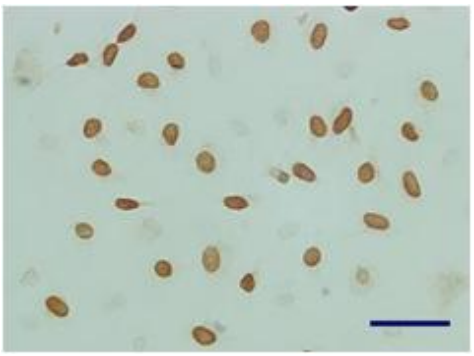


Scale Bar = 20 μM

図 7.　3 つの神経幹・前駆細胞のマーカーNestin（赤：A）、SOX2（緑：B）、GFAP（青：C）それぞれの染色像および蛍光三重染色像（D）

1－2）C　増殖能についての検討

細胞周期の S 期に取り込まれるチミジンアナログで増殖細胞のマーカーとなる BrdU を細胞に取り込ませた後、BrdU を酵素抗体法、DAB 発色により検出した。核が茶褐色で示される BrdU 陽性細胞が多数あること（図 8）から分裂能を有することが確認された。



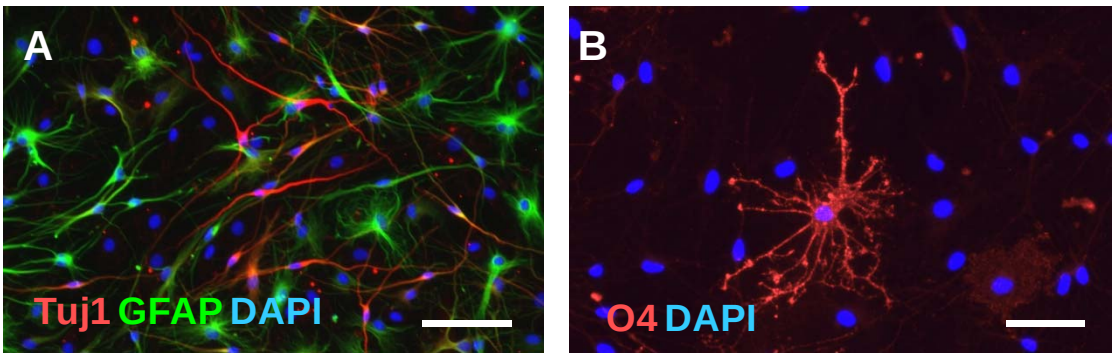
Scale Bar = 50 μM

図 8.　増殖能のマーカーBrdU の DAB 発色（茶褐色）像

一方で、この細胞は継代を約 15-20 代程度繰り返すと細胞が小さく丸くなるといった形態変化を起こし Nestin 陰性の細胞が現れるとともに、増殖能は低下し、その後増殖能は消失することが確認された。従って、この細胞の増殖能は無限ではなかった。このような特徴の変化をきたすことから、以下で述べる実験においては、特徴が安定した状態の継代数 7-13 代の細胞を形態と Nestin の発現をチェックしてから使用することにした。

1－2）D　多分化能についての検討

分化誘導因子として知られている retinoic acid (1 μM)と FBS (0.5%)を FGF 非存在下で 7 日間培養し、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトの各マーカーを蛍光免疫染色にて検出した。その結果ニューロンのマーカーである Tuj1 陽性細胞、アストロサイトのマーカーである GFAP 陽性細胞が検出された。GFAP の発色は、分化前にも弱いながら認められていたが、分化誘導後の GFAP 陽性細胞の発色は強いものであり、またその形態も分化前と明らかに異なり成熟グリア特有の形態を示していた（図 9A）。Tuj-1 陽性ニューロン、GFAP 陽性アストロサイトは、それぞれ総細胞数中の約 40%, 約 30%の割合であった。さらに、数は非常に少ないがオリゴデンドロサイトのマーカーである O4 陽性細胞も検出された（図 9B）。以上のことから ADP がニューロン、グリアへの分化能を有することが確認された。



Scale Bar = 100 μM　　Scale Bar = 60 μM

図 9.（A）ニューロンのマーカーTuj-1（赤）とアストロサイトのマーカーの GFAP（緑）の蛍光二重染色像。（B）オリゴデンドロサイトのマーカー O4（赤）及び核染色 DAPI（青）蛍光二重染色像。

2. 抗うつ薬、NA、5-HT が ADP の増殖、分化、アポトーシスに及ぼす影響についての検討

成体ラット海馬歯状回由来の神経前駆細胞である ADP を確立できたので、抗うつ薬の神経新生増加のメカニズムを明らかにするために､抗うつ薬並びにその作用により脳内で増加する NA、5-HT の ADP の増殖、分化、アポトーシスに及ぼす影響について検討した。抗うつ薬としては *in vivo* で投与すると海馬神経新生を促進することが報告されている 4 つのタイプの抗うつ薬、SSRI (fluoxetine)、三環系抗うつ薬 (imipramine)、NA 選択的再取り込み阻害薬 (reboxetine)、モノアミン酸化酵素阻害薬 (tranylcypromine) を用いた (Malberg et al., 2000)。

2－1）抗うつ薬が ADP 増殖に及ぼす影響についての検討

抗うつ薬が ADP 増殖に及ぼす影響について Alamar Blue assay を用いて細胞数を指標に検討した。濃度は 0.01 μM から 10 μM まで用いたが、いずれの抗うつ薬も ADP の細胞数を増加させなかった（図 10）。fluoxetine、imipramine においては 10 μM という非常に高濃度では細胞数を減少させたが、これらの処置群の細胞を顕微鏡で観察すると細胞障害性が確認された。従って、抗うつ薬には ADP の直接的な増殖促進作用は無いと考えられた。

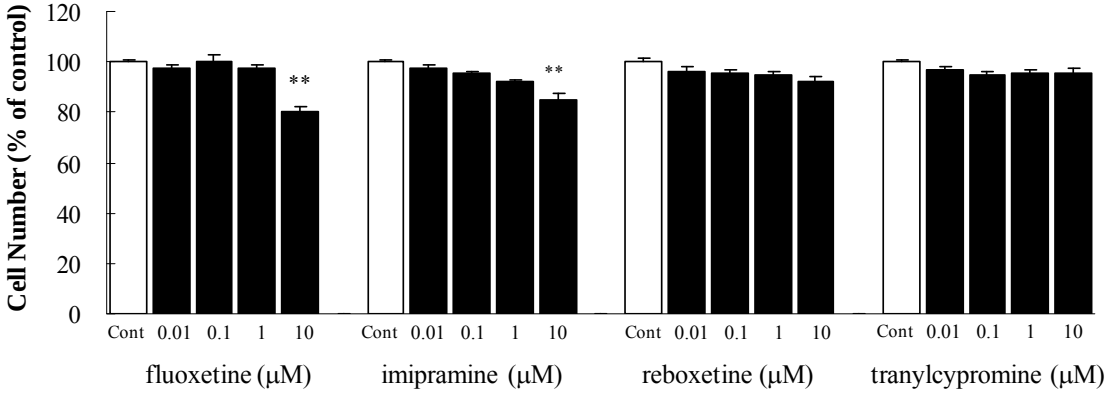


図 10. 抗うつ薬が ADP 増殖に及ぼす影響

4 種の抗うつ薬 SSRI (fluoxetine)、三環系抗うつ薬 (imipramine)、NA 選択的再取り込み阻害薬 (reboxetine)、モノアミン酸化酵素阻害薬 (tranylcypromine) を ADP と増殖培地下で 3 日間処置した。生細胞数は Alamar Blue assay によって測定した。Control (Cont) 群に対する比率を平均値±平均値の標準誤差で示した(n = 12)。$^{**}p < 0.001$ vs Cont. (Dunnett's test).

2－2）NA、5-HT が ADP 増殖に及ぼす影響についての検討

2－2A）　細胞数を指標として

次に抗うつ薬によりシナプス間隙において濃度上昇が見られる NA、5-HT の ADP の増殖に及ぼす影響について Alamar Blue assay を用いて細胞数を指標に検討した。濃度は 0.01 μM から 10 μM まで用い、3 日間処置した。その結果、NA は 1 μM、10 μM 処置によってそれぞれ無処置群に比べ 117 ± 6%、125 ± 4%と有意に細胞数を増加させた（図 11A）。一方、5-HT は細胞数に影響を及ぼさなかった（図 11B）。

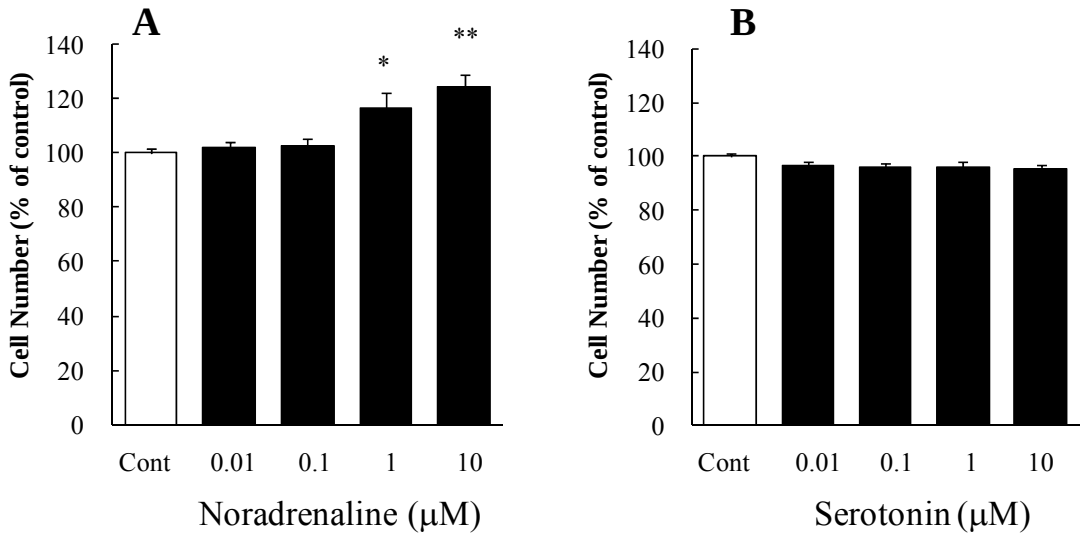


図 11.　NA、5-HT が ADP 増殖に及ぼす影響

NA、5-HT を ADP と増殖培地下で 3 日間処置した。生細胞数は Alamar Blue assay によって測定した。Control (Cont) 群に対する比率を平均値±平均値の標準誤差で示した(n = 12)。*p < 0.01, **p < 0.001 vs Cont. (Dunnett's test).

2－2B）　DNA 合成を指標として

ADP 数を増加させた 1、10 μM NA 処置した細胞において、細胞の形態に変化がないことを顕微鏡下で確認したが、この NA の細胞数の増加作用が増殖促進では無くアポトーシス抑制といった他の作用の可能性を完全には否定できない。そこで、NA、5-HT の細胞増殖に対する作用をより明確にするために、次に BrdU ELISA を用いて DNA 合成を指標に検討した。その結果、細胞数の検討結果と同様に、NA は 1 μM、10 μM 処置によってそれぞれ無処置群に比べ 126 ± 6%、161 ± 7%と有意な ADP の DNA 合成促進作用を示した（図 12A)。一方、5-HT はいずれの濃度においても ADP の DNA 合成に影響を及ぼさなかった（図 12B)。以上のことから、5-HT には ADP の増殖促進作用は無いが、NA は ADP の増殖促進作用を有することが確認された。

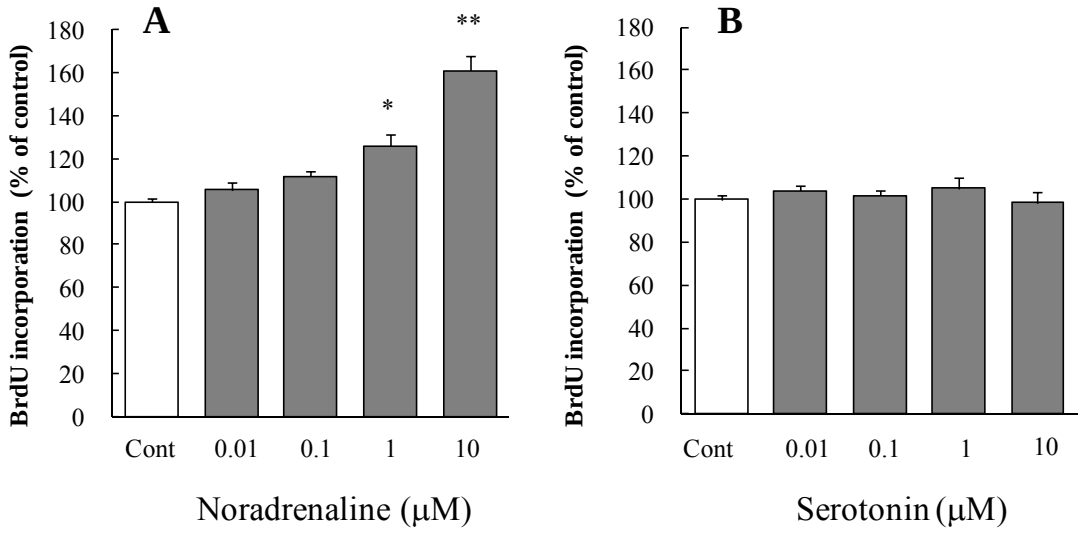


図 12.　NA、5-HT が ADP の DNA 合成に及ぼす影響

NA、5-HT を ADP と増殖培地下で 3 日間処置した。DNA 合成は BrdU ELISA によって測定した。Control (Cont) 群に対する比率を平均値±平均値の標準誤差で示した(n = 12)。*p < 0.01, **p < 0.001 vs Cont. (Dunnett's test).

2－3）抗うつ薬がレチノイン酸による ADP 分化誘導に及ぼす影響についての検討

レチノイン酸存在下では、ADP は Tuj-1 陽性ニューロン、GFAP 陽性アストロサイトにそれぞれ約 40%, 約 30%の割合で分化する。この ADP のニューロン、アストロサイトへの分化誘導対して 4 種の抗うつ薬 (fluoxetine、imipramine、reboxetine、tranylcypromine) が及ぼす影響ついて検討した。濃度は薬剤による細胞障害性が認められない最高濃度の 1 μM を用いた。その結果、いずれの抗うつ薬も ADP のニューロン分化、アストロサイト分化について有意な影響を及ぼさなかった（図 13)。

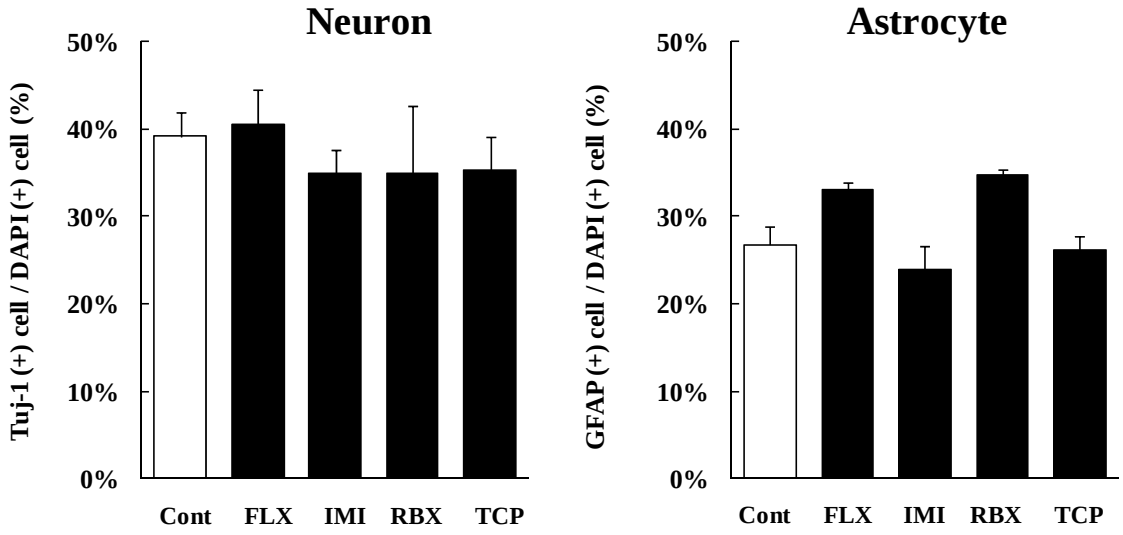


図 13. 抗うつ薬が ADP のニューロン、アストロサイト分化誘導に及ぼす影響

分化誘導培地下において 4 種の抗うつ薬 fluoxetine (FLX)、imipramine (IMI)、reboxetine (RBX)、tranylcypromine (TCP)を ADP と 7 日間処置した。ニューロンのマーカーである Tuj1、アストロサイトのマーカーである GFAP の各陽性細胞数を総細胞数に対する割合で評価した。グラフは平均値±平均値の標準誤差を示す(n = 3)。Control (Cont) 群のみ n = 10。

2－4）NA、5-HT がレチノイン酸による ADP 分化誘導に及ぼす影響

レチノイン酸による ADP のニューロン、アストロサイトへの分化誘導に対する NA、5-HT が及ぼす影響について検討した。濃度は 1、10 μM を用いた。その結果、NA、5-HT いずれもニューロン分化、アストロサイト分化について有意な変化は及ぼさなかった（図 14）。

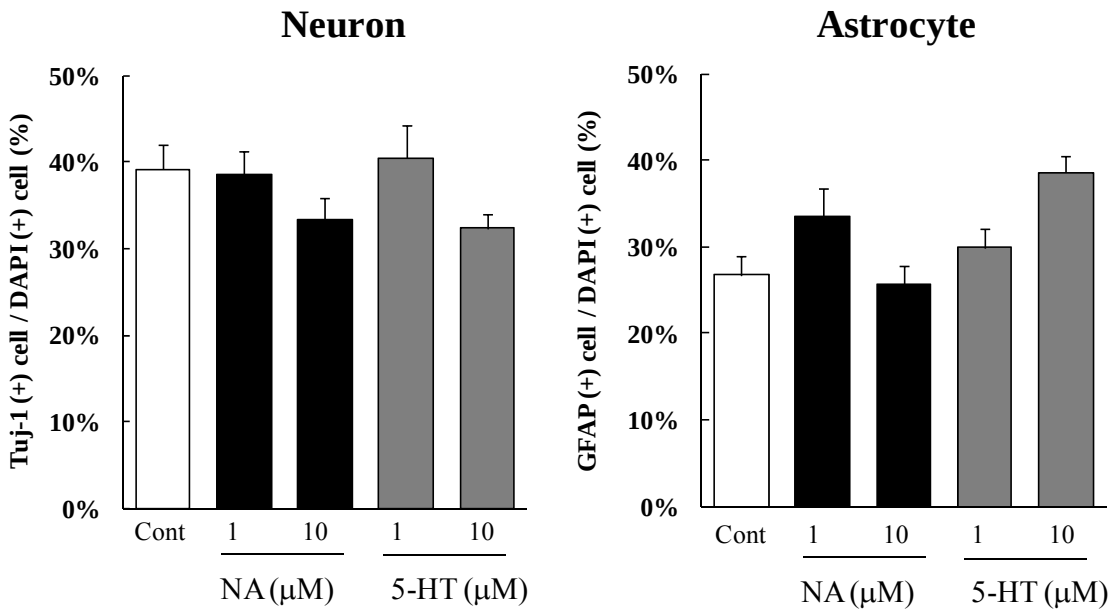


図 14.　NA、5-HT が ADP のニューロン、アストロサイト分化誘導に及ぼす影響

分化誘導培地下で NA、5-HT を ADP と 7 日間処置した。ニューロンのマーカーである Tuj1、アストロサイトのマーカーである GFAP の各陽性細胞数を総細胞数に対する割合で評価した。グラフは平均値±平均値の標準誤差を示す (n = 3)。Control (Cont) 群のみ n = 10。

2－5）抗うつ薬がスタウロスポリンによる ADP のアポトーシスに及ぼす影響についての検討

予備試験により ADP は、汎用されているキナーゼ阻害剤のスタウロスポリン 300 nM で 3 日間処置することで約 30%がアポトーシスすることが確認された。そこでこのスタウロスポリン誘発の ADP アポトーシス対する 4 種の抗うつ薬 (fluoxetine、imipramine、reboxetine、tranylcypromine)が及ぼす影響ついて検討した。濃度は薬剤による細胞障害性が認められない最高濃度の 1 μM を用いた。その結果、いずれの抗うつ薬もスタウロスポリン誘発 ADP アポトーシスに対して有意な影響を及ぼさなかった（図 15）。

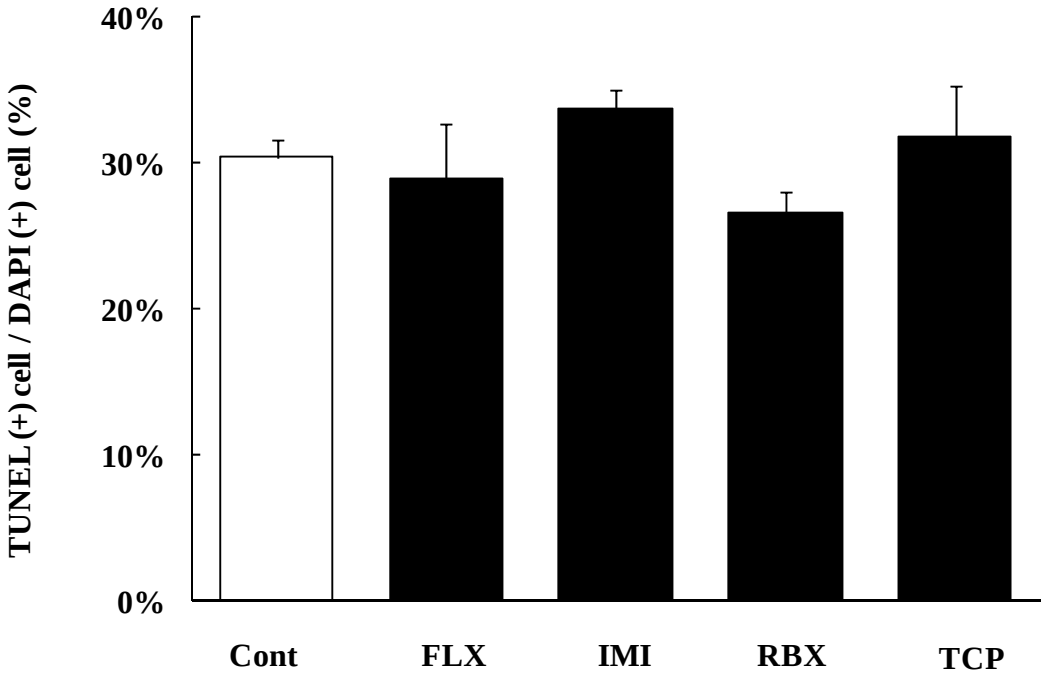


図 15.　抗うつ薬が ADP のアポトーシスに及ぼす影響

スタウロスポリン 300 nM 含有の増殖培地下において 4 種の抗うつ薬 fluoxetine (FLX)、imipramine (IMI)、reboxetine (RBX)、tranylcypromine (TCP) を ADP と 3 日間処置した。アポトーシスが誘導された細胞を TUNEL 染色により検出し、TUNEL 陽性細胞数を総細胞数に対する割合で評価した。グラフは平均値±平均値の標準誤差を示す (n = 4)。Control (Cont) 群のみ n = 12。

2－6）NA、5-HT がスタウロスポリンによる ADP のアポトーシスに及ぼす影響についての検討

スタウロスポリン誘発の ADP アポトーシスに対する NA、5-HT が及ぼす影響について検討した。濃度は 1、10 μM を用いた。その結果、NA、5-HT いずれもスタウロスポリン誘発 ADP アポトーシスに対して有意な変化を及ぼさなかった（図 16）。

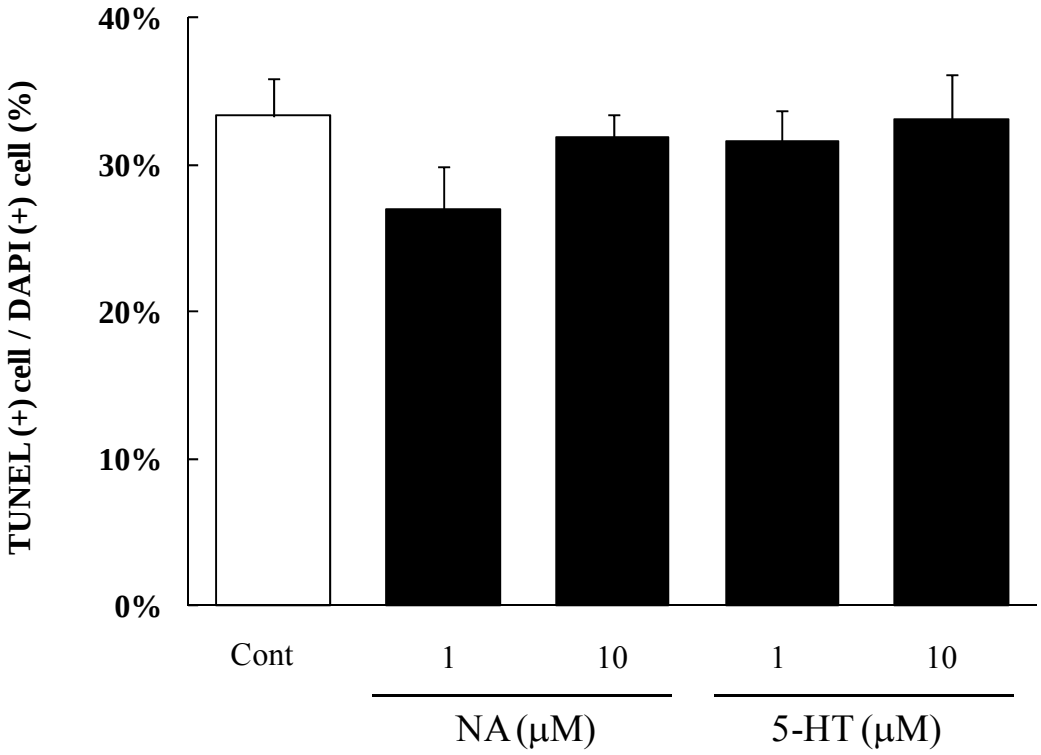


図 16.　NA、5-HT が ADP のアポトーシスに及ぼす影響

スタウロスポリン 300 nM 含有の増殖培地下において NA、5-HT を ADP と 3 日間処置した。アポトーシスが誘導された細胞を TUNEL 染色により検出し、TUNEL 陽性細胞数を総細胞数に対する割合で評価した。グラフは平均値±平均値の標準誤差を示す(n = 4)。Control (Cont) 群のみ n = 8。

3. ADP における NA、5-HT の発現及び各レセプター、トランスポーター mRNA 発現の検討

3－1） ADP 可溶化液及び ADP の培養上清中の NA、5-HT 測定

ADP 可溶化液及び ADP の培養上清中に含まれる NA、5-HT 量について HPLC を用いて検討した。その結果、ADP 播種 1、2、3 日後のいずれの可溶化液及び培養上清においても NA、5-HT は検出されなかった（検出限界は、NA、5-HT はいずれも 1 nM）。

3－2） ADP におけるアドレナリンレセプター (Adrenergic Receptor, AR)、5-HT レセプター (5-HT Receptor, 5-HTR)、モノアミントランスポーター mRNA 発現の検討

AR のサブタイプ、5-HTR のサブタイプ及び抗うつ薬のターゲット分子である 5-HT トランスポーター (serotonin transporter, SERT)、NA トランスポーター (noradrenaline transporter, NAT) の ADP における mRNA 発現を RT-PCR 法によって検討した。NA のレセプターは大きく分けてα_1-、α_2-、β-ARs の 3 つのサブファミリーに分類され、さらにそれぞれが 3 つのサブタイプ$\alpha_{1A, 1B, 1D}$; $\alpha_{2A, 2B, 2C}$; $\beta_{1, 2, 3}$に分類され合計 9 つのサブタイプが存在することが知られている (Pupo and Minneman, 2001)。NA が ADP の増殖促進作用を示したことから 9 つのサブタイプ全ての mRNA 発現について検討した。その結果、α_{1A}、α_{1B}、α_{1D}、α_{2C}、β_1、β_2 の 6 つの AR のサブタイプの mRNA 発現が確認された（図 17A）。5-HTR のサブタイプは 14 種類あるが (Hoyer et al., 2002)、神経新生の制御と関わることが示唆されている 5-HT_{1A} と 5-$HT_{2A, 2B, 2C}$ の 4 つの 5-HTR サブタイプ (Banasr et al., 2004; Benninghoff et al., 2010; Santarelli et al., 2003) の mRNA 発現について検討した。その結果、5-HT_{1A}R 、5-HT_{2C}R の mRNA 発現は認められなかったが、5-$HT_{2A, 2B}$ R の mRNA 発現が認められた（図 17B）。また、ADP には SERT、NAT いずれも弱いながら mRNA の発現が確認された（図 17C）。

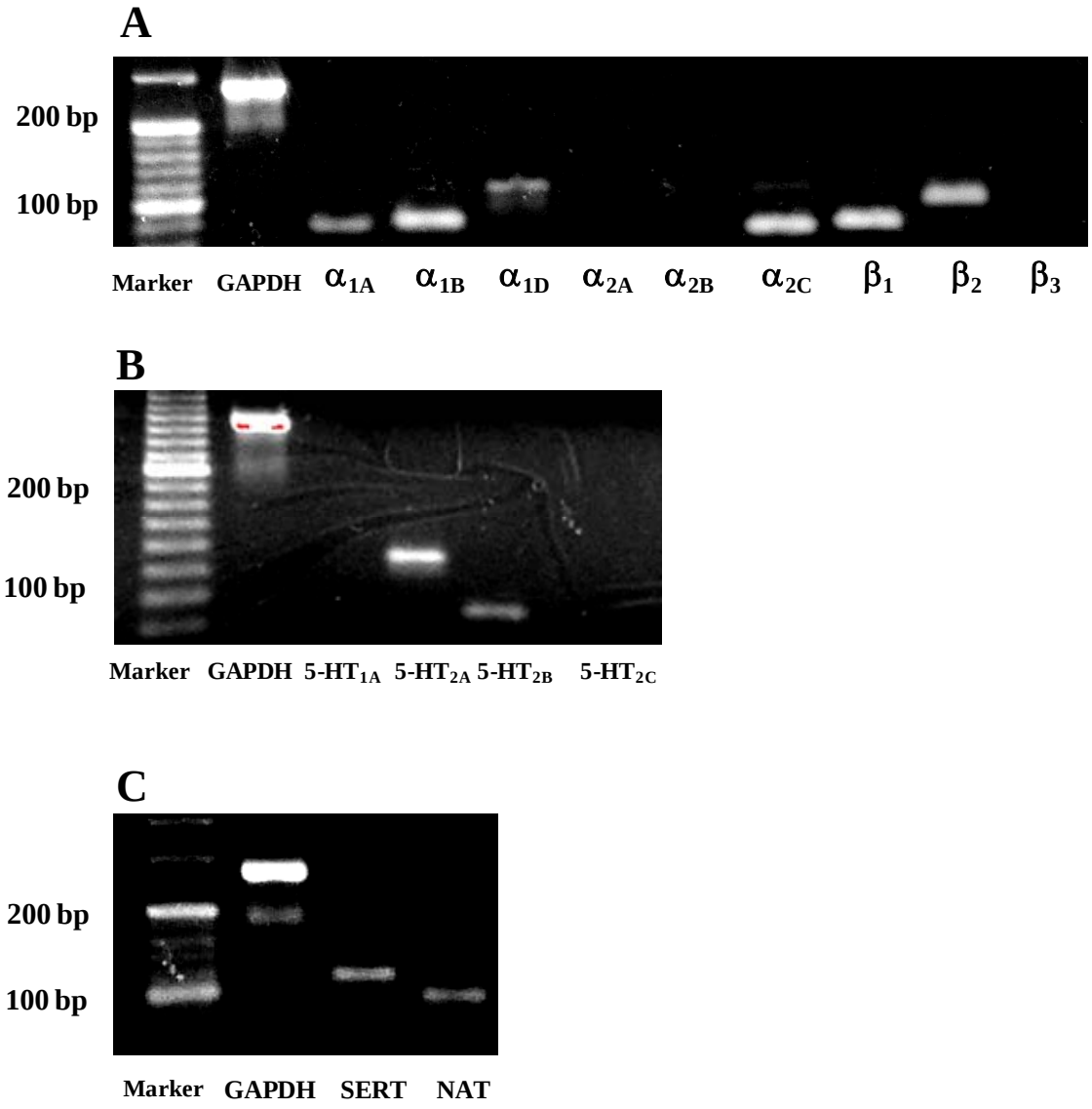


図 17.　ADP におけるアドレナリンレセプター、5-HT レセプター、モノアミントランスポーターの mRNA 発現

RT-PCR 反応生成物をエチジウムブロマイド含有の 3%アガロースゲルを用いて電気泳動し検出した。内部標準として GAPDH を用いた。(A) AR サブタイプ mRNA 発現、(B) 5-HTR サブタイプ mRNA 発現、(C)トランスポーターの mRNA 発現。

4. NA の ADP 増殖促進作用の作用レセプターの同定

これまでの検討により、NA に ADP の増殖促進作用が認められたので、この NA の作用するレセプターの検討を実施した。検討の際には、NA の作用が明確に認められる 10 μM の NA を用いた。また評価方法としては、NA の作用が Alamar Blue assay と BrdU incorporation assay でどちらも同じ傾向を示したので、操作が簡便である Alamar Blue assay を用いた。

4－1）NA の ADP 増殖促進作用に対する非選択的 AR アンタゴニストの作用の検討

ADP にはα_{1A}、α_{1B}、α_{1D}、α_{2C}、β_1、β_2 の 6 つの AR のサブタイプの mRNA 発現が確認されたので、まずそれぞれのサブファミリーに対するアンタゴニスト（非選択的 AR アンタゴニスト）を用いて、NA の ADP 増殖促進作用に対する拮抗実験を実施した。その結果、$\alpha_{1/2}$-AR 非選択的アンタゴニストの phentolamine (10 μM)、α_1-AR 非選択的アンタゴニストの prazosin (1 μM)、α_2-AR 非選択的アンタゴニストの yohimbine (1 μM) は、いずれも NA (10 μM) による ADP の増殖促進作用に影響を及ぼさなかった（図 18A）。一方、β-AR 非選択的アンタゴニストの propranolol (1 μM) と timolol (1 μM) は、いずれも NA (10 μM) による ADP の増殖促進作用を完全に拮抗した。また、これら β-AR 非選択的アンタゴニストは、NA 非存在下における ADP 増殖には影響を及ぼさなかったことから、これらの拮抗作用は細胞障害性などの非特異的な阻害によるものではないと考えられた（図 18B）。

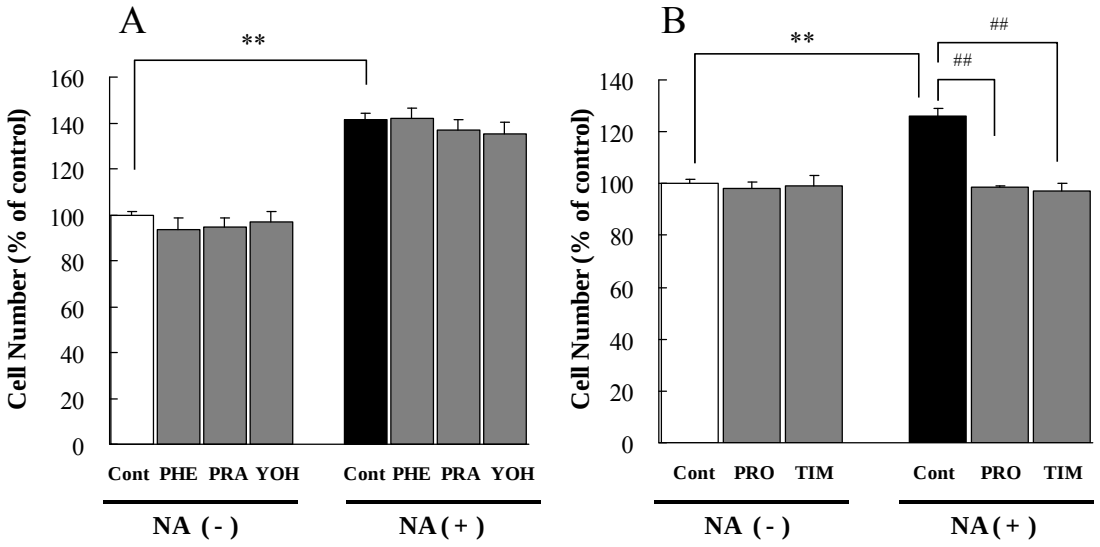


図 18　NA の ADP 増殖促進作用に対する非選択的 AR アンタゴニストの作用

A : NA の ADP 増殖促進作用に対するα-AR 非選択的アンタゴニスト の作用$\alpha_{1/2}$-AR 非選択的アンタゴニストの phentolamine (PHE, 10 μM)、α_1-AR 非選択的アンタゴニストの prazosin (PRA, 1 μM)、α_2-AR 非選択的アンタゴニストの yohimbine (YOH, 1 μM) をそれぞれ NA (10 μM) 存在、非存在下で 3 日間処置した。

B : NA の ADP 増殖促進作用に対するβ-AR 非選択的アンタゴニストの作用

β-AR 非選択的アンタゴニストの propranolol (PRO, 1 μM) と timolol (TIM, 1 μM) をそれぞれ NA (10 μM) 存在、非存在下で 3 日間処置した。生細胞数は Alamar Blue assay によって測定した。NA 非存在下の Control (Cont) 群に対する比率を平均値±平均値の標準誤差で示した (n = 8)。 **p < 0.001 vs NA 非存在下の Cont. (Student's t-test)、##p < 0.001 vs NA 存在下の Cont. (Student's t-test)。

4－2）非選択的β-AR アゴニストが ADP の増殖に及ぼす影響についての検討

ADP の増殖には β-AR の関与が示唆されたので、非選択的β-AR アゴニストの isoproterenol を用いて、ADP の増殖作用について検討した。その結果、isoproterenol は 1 μM、10 μM 処置によって無処置群に比べ有意な ADP 増殖促進作用を示した（図 19）。

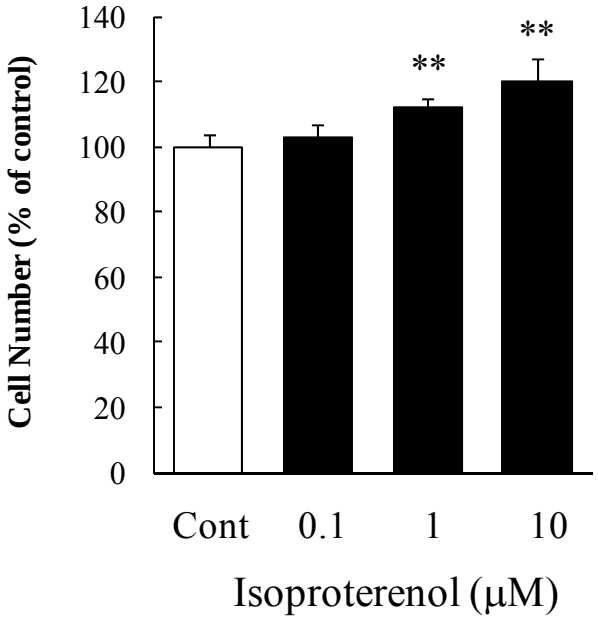


図 19.　非選択的β-AR アゴニストが ADP 増殖に及ぼす影響

増殖培地下で非選択的 β-AR アゴニストの isoproterenol を ADP に 3 日間処置した。生細胞数は Alamar Blue assay によって測定した。Control (Cont) 群に対する比率を平均値±平均値の標準誤差で示した(n = 8)。**p < 0.001 vs Cont. (Dunnett’s test)。

4－3) NA の ADP 増殖促進作用に対するβ-AR サブタイプ選択的アンタゴニストの作用の検討

先の実験により、NA の ADP 増殖促進作用には、β-AR を介していることが明らかとなったため、次にどのβ-AR サブタイプが関与しているかを検討した。β-AR は、β_1, β_2, β_3-AR の 3 つのサブタイプが存在するが、図 17 に示すように ADP にはβ_3-AR の mRNA 発現は認められなかった。そこで、β_1, β_2, -AR の選択的アンタゴニスト用いて NA の ADP 増殖促進作用に対する拮抗実験を実施した。その結果、β_1-AR 選択的アンタゴニストの CGP20712A (0.1 μM) は、NA による ADP の増殖促進作用に影響を及ぼさなかった（図 20)。一方、β_2-AR 選択的アンタゴニスト ICI-118,551 (0.1 μM)は、NA による ADP の増殖促進作用を完全に拮抗した。また、ICI-118,551 は NA 非存在下における ADP 増殖には影響を及ぼさなかったことから、ICI-118,551 の作用は細胞障害性などの非特異的な阻害によるものではないと考えられた(図 20)。

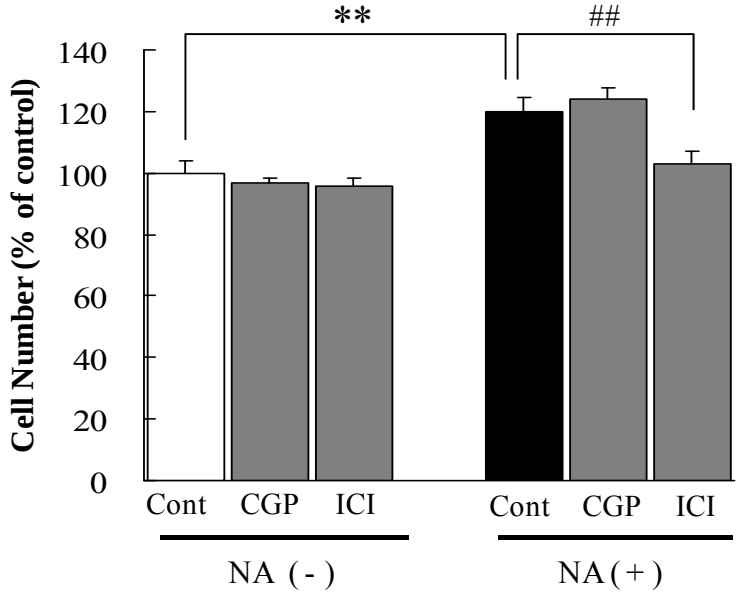


図 20.　NA の ADP 増殖促進作用に対するβ-AR サブタイプ選択的アンタゴニストの作用

β_1-AR 選択的アンタゴニストの CGP20712A (CGP, 0.1 μM)、β_2-AR 選択的アンタゴニストの ICI-118,551 (ICI, 0.1 μM) をそれぞれ NA (10 μM) 存在、非存在下で 3 日間処置した。生細胞数は Alamar Blue assay によって測定した。Control (Cont) 群に対する比率を平均値±平均値の標準誤差で示した(n = 8)。**p < 0.001 vs NA 非存在下の Cont. (Student's t-test)、##*p* < 0.001 vs NA 存在

下の Cont. (Student's t-test)。

4－4） β-AR サブタイプ選択的アゴニストが ADP の増殖に及ぼす影響についての検討

ADP の増殖に関与するβ-AR サブタイプの関与をより明確にするために、β_1, β_2, -AR の選択的アゴニスト用いての NA の ADP 増殖促進作用を検討した。その結果、β_1-AR 選択的アゴニストの xamoterol (0.1-10 μM) は、ADP の増殖作用に影響を及ぼさなかった（図 21A)。一方、β_2-AR 選択的アゴニストの salmeterol (1 - 100 nM) は、1 nM から無処置群に比べ有意な ADP 増殖促進作用を示した(図 21B)。以上のことから NA の ADP 増殖促進作用は、β_2-AR を介していることが明らかとなった。

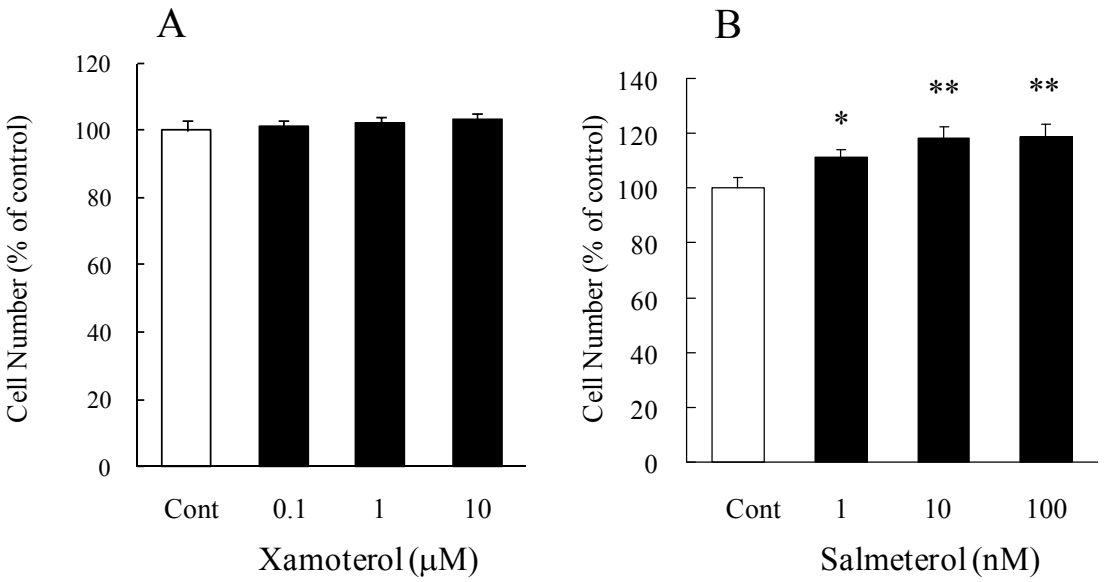


図 21.　β-AR サブタイプ選択的アゴニストが ADP 増殖に及ぼす影響

増殖培地下でβ_1-AR 選択的アゴニストの xamoterol (0.1 - 10 μM)、β_2-AR 選択的アゴニストの salmeterol (1 - 100 nM)を ADP に 3 日間処置した。生細胞数は Alamar Blue assay によって測定した。Control (Cont) 群に対する比率を平均値±平均値の標準誤差で示した(n = 8)。*p < 0.01, **p < 0.001 vs Cont. (Dunnett's test)。

考察

細胞について

今回確立した ADP は、「①神経幹・前駆細胞特異的抗原マーカー (Nestin, SOX2)が発現している②自己増殖能を有する③ニューロン、グリア細胞への分化能を有する」という神経幹・前駆細胞の 3 つの特徴を有していた。海馬の神経幹・前駆細胞は *in vivo* の解剖学的研究により、その形態・特異的マーカーの発現・増殖能・分化能といった特徴に基づいて、type-1 (stem cell)、type-2a、type-2b (transiently amplifying progenitor cell)、type-3 (progenitor cell) の大きく 4 つの分化段階（ステージ）に分類されている (表４、Kempermann et al., 2004)。ADP は免疫染色により、Nestin、SOX2、GFAP 陽性である一方で immature neuron マーカーの DCX、Prox1 は陰性であることが確認された。特異的マーカーの発現として Nestin、GFAP、SOX2 陽性、DCX, Prox1 陰性という特徴は、type-1、type-2a 両タイプの cell の特徴と一致する。一方で、増殖能に関しては type-1 cell が無限であるのに対し、type-2a は有限 (limited) とされている。ADP は BrdU 取り込み試験により増殖能は確認されたが、長期間培養を続けると増殖能が失われることから増殖能は有限 (limited) であった。従って、ADP は type-2a early progenitor cells によく似た特徴を有する神経前駆細胞であると考えられた (表 4、Boku et al., 2009)。

Stage		**Stem Cell**	**Transiently Amplifying Progenitor Cell**		**Progenitor Cell**	**ADP**
		Type-1	**Type-2a**	**Type-2b**	**Type-3**	**Type-2a like**
Marker の発現	Nestin	＋	＋	＋/－	－	＋
	Sox2	＋	＋	－	－	＋
	DCX	－	－	＋	＋	－
増殖能		Unlimited	Limited	Limited	Limited	Limited

表 4 成体海馬歯状回における神経幹・前駆細胞の分類と ADP の特徴の比較
成体海馬の神経幹・前駆細胞は、その形態・特異的マーカーの発現・増殖能・分化能といった特徴に基づいて、大きく４つのタイプに分類されている。ADP は、Type-2a progenitor cell に類似した特徴を有する。

抗うつ薬が海馬のどのステージの神経幹・前駆細胞を増殖させるのかといった研究はほとんどなさていないが、興味深いことに Encinas ら (2006) は *in vivo* の解剖学的研究によって、SSRI のひとつである fluoxetine 投与によって増殖する海馬神経幹･前駆細胞のタイプは type-1 に相当する stem-like cell ではなく、type-2a に相当する early progenitor cells であることを示している。このことは、抗うつ薬による海馬神経新生作用メカニズムを検討するという観点からすると type-2a early progenitor like な細胞と考えられる ADP を用いての検討は非常に有用であると考えられた。

抗うつ薬の作用について

抗うつ薬の作用機序は、一般的にはモノアミントランスポーターの阻害などによる脳内モノアミン増加作用である。従って、細胞に抗うつ薬を添加した場合においても、細胞外モノアミンの増加を介した作用が考えられた。しかしながら、ADP には NA、5-HT のトランスポーターの NAT、SERT の mRNA は発現していたが、細胞の可溶化液中、培養上清中に NA、5-HT は検出されなかった。従って、本実験条件において ADP に抗うつ薬処置をしても、NA、5-HT 増加を介した作用は無いと考えられた。一方で、抗うつ薬にはモノアミン増加を介さない､直接的な全く異なる作用もあることも報告されている (Hisaoka et al., 2007; Lai et al., 2003)。そこで、*in vivo* で海馬神経新生を増加させることが知られている 4 つの抗うつ薬 (Malberg et al., 2000) すなわち SSRI (fluoxetine)、三環系抗うつ薬 (imipramine)、NA 選択的再取り込み阻害薬 (reboxetine)、モノアミン酸化酵素阻害薬 (tranylcypromine) を用いて ADP の増殖、レチノイン酸誘発ニューロン分化誘導､スタウロスポリン誘発アポトーシス誘導に対する直接作用を検討したが、いずれの抗うつ薬にも作用は見出せなかった。従って、抗うつ薬による ADP に対する直接作用は無いものと考えられた。このことは抗うつ薬は海馬における type-2a early progenitor cell に対する直接作用が無いことを示唆している。

5-HT の作用について

5-HT 神経を破壊すると海馬における神経幹・前駆細胞の数が減少することや (Brezun and Daszuta, 1999)、5-HT を増加させる抗うつ薬の SSRI が海馬神経幹・前駆細胞を増やすことが数多く報告されていることから (Encinas

et al., 2006; Malberg et al., 2000; Santarelli et al., 2003)、5-HT が ADP を増やすことが期待された。しかしながら、0.01 - 10 μM の 5-HT 処置によって ADP の細胞数、DNA 合成に対する作用は認められなかった。また、分化やアポトーシスに対する作用も確認できなかった。5-HT 処置前の ADP の培養条件中に 5-HT は検出されていないことから、5-HT 処置前の段階で 5-HT の ADP に対する作用が飽和しているということは考えられず、また処置濃度も幅広く十分高い濃度まで用いたことから 5-HT の ADP に対する作用は無いと考えられた。このことは 5-HT は海馬歯状回における type-2a early progenitor cell に対する直接作用が無いことを示唆している。

今回、5-HT の ADP に対する作用は見出せなかったが、5-HT のレセプターは 14 種類も存在することから (Hoyer et al., 2002)、各 5-HTR の刺激によって増加、減少の作用が異なりその作用が相殺され、total として 5-HT の作用が検出されていない可能性は否定できない。従って、ADP に mRNA 発現が確認された 5-HT_{2A}R、5-HT_{2B}R を含む各 5-HTR サブタイプの明確な関与を知る上では、各サブタイプに対する選択的リガンドを用いた試験が必要であると考えられる。

先に記したように、fluoxetine 投与によって増殖する細胞は type-2a early progenitor cells であることが示されているが (Encinas et al., 2006)、fluoxetine そのものにも fluoxetine によって脳内で増加する 5-HT にも type-2a early progenitor cell に相当すると考えられる ADP の増殖促進作用が認められなかった。fluoxetine の海馬神経新生促進作用は 5-HT_{1A}R を介していることが示唆されているが (Santarelli et al., 2003)、ADP には 5-HT_{1A}R の mRNA 発現が認められなかった。最近、神経幹・前駆細胞の増殖作用を有する VEGF (Warner-Schmidt and Duman, 2007)を、fluoxetine がニューロンや血管内皮細胞といった成熟細胞上の 5-HT_{1A}R 刺激を介して誘導することが報告されている (Greene et al., 2009)。従って、少なくとも fluoxetine は、脳内の 5-HT 増加、5-HT による成熟細胞の 5-HT_{1A}R 活性化、VEGF 発現誘導を介して間接的に神経幹・前駆細胞を増殖していることが示唆される。

NA の作用について

NA には ADP の細胞数の増加作用だけでなく DNA 合成促進作用が認められた。従って、NA は ADP の増殖促進作用を有していることが示された。この結果は、NA を増加させる抗うつ薬（NA 選択的再取り込み阻害薬など）が海馬神経幹・前駆細胞を増やすこと (Malberg et al., 2000; Santarelli et al.,

2003; Warner-Schmidt and Duman, 2007) や NA 神経を破壊すると海馬における神経幹・前駆細胞の数が減少する (Kulkarni et al., 2002)といった *in vivo* 研究と一致する。さらに解剖学的研究によって、NA 神経が海馬歯状回における神経幹・前駆細胞とコンタクトしていることが示されている (Rizk et al., 2006)。以上のことから、*in vivo* において NA が直接、type-2a early progenitor cells に作用して、増殖促進していることが示唆される。

ADP には、9 つ存在する AR サブタイプのうちのα_{1A}-、α_{1B}-、α_{1D}-、α_{2C}-、β_1-、β_2- ARs の 6 つのサブタイプの mRNA が発現していることが確認された。NA の ADP 増殖促進作用が複数のα-AR 非選択的アンタゴニストで拮抗されず、複数のβ-AR 非選択的アンタゴニスト及びβ_2- AR 選択的アンタゴニストよって完全に拮抗されたこと、さらにはβ_2-AR 選択的アゴニストによって ADP の増殖が促進されたことから、NA の ADP 増殖促進作用にβ_2-AR が関与していることが明らかとなった。海馬歯状回の神経前駆細胞の増殖や神経新生にβ_2-AR が関与しているという報告はこれまでに無いことから、新しい知見であると考えられる。

最近になって、Jhaveri ら(2010)が成体マウス海馬由来の stem-like cell を NA がβ_2-AR でなくβ_3-AR を介して増殖促進させることを報告した。興味深いことに、Jhaveri らの細胞にはβ_3-AR は発現しているが、β_2-AR は発現していない。一方、ADP にはβ_2-AR は発現していたが、β_3-AR は発現していなかった。使用した動物の違い（マウスとラット）、用いた脳組織の違い（海馬全体と歯状回に限局）、培養方法の違い（neurhosphere 法と monolayer 法）など様々な実験条件の違いがあるが、重要なのは用いた細胞の最終的な特徴の違いつまり Jhaveri らの細胞が stem-like cell (type-1 like) であるのに対して ADP は early progenitor cell (type-2a like)といった違いなのかもしれない。これらのことを合わせ考えると、NA は様々なタイプの海馬神経幹・前駆細胞の増殖を直接的に制御している重要な神経伝達物質であり、その制御の仕方は type-1 や type-2a といった細胞のタイプによって異なることを示唆している。従って、NA 選択的再取り込み阻害薬のような NA を増加させる抗うつ薬は、神経幹・前駆細胞上のβ_2-AR とβ_3-AR を活性化して神経新生を促進していることが示唆される。

今後の展望

緒言でも述べたように海馬神経新生促進作用はうつ病の治療メカニズムである可能性が示唆されている (Dranovsky and Hen, 2006; Duman et al.,

2001; Warner-Schmidt and Duman, 2006)。従って、今回のβ_2-AR が海馬神経前駆細胞の増殖に関与するという知見は、β_2-AR 刺激により海馬神経新生が促進され、抗うつ作用をもたらすといったことが推測される。これまでに、β_2-AR アゴニストが動物実験で抗うつ薬様作用を示すことや (O'Donnell, 1990)、臨床においてもβ_2-AR アゴニストである salbutamol が少数例のうつ病患者を用いた研究で有効性を示したことが報告されている (Lecrubier et al., 1980; Lerer et al., 1981)。しかしながら、これらの作用と海馬神経新生が関連しているかどうかは現在不明である。海馬歯状回には β_2-AR が多く分布していることから (Nicholas et al., 1993)、β_2-AR 刺激による海馬神経新生促進作用は期待が持たれるところであり、今後は、*in vivo* でβ_2-AR 刺激により海馬神経新生が促進されるかどうか、さらには神経新生促進を介した抗うつ作用が認められるかどうかといった研究が必要と考えられる。

また、*in vitro* の試験系においては、*in vivo* の生理的環境を充分に反映させることができていないことを考慮しなければならない。本研究においても、ADP の増殖は bFGF に依存的であり、また分化誘導はレチノイン酸、アポトーシス誘導はスタウロスポリンに依存する評価系である。従って *in vivo* をより確度高く予測するためには、異なる複数の実験条件における ADP の増殖、分化、アポトーシスに対する抗うつ薬、NA、5-HT の作用を検討する必要があると考えられる。また、ADP は type-2a early progenitor cell に相当する細胞と考えられたが、抗うつ薬の海馬神経新生促進のメカニズムを明らかにするためには、今後は違うタイプの細胞の培養系を確立し、抗うつ薬、NA、5-HT の作用を検討すべきであると考えられる。

総括および結論

抗うつ薬の成体海馬神経新生促進作用のメカニズムを検討する目的で、研究を実施し、以下の新しい知見を見出した。

・成体海馬神経前駆細胞の ADP の培養系を確立し、その特徴は type-2a early progenitor cell に相当すると考えられた。

・NA は ADP のレチノイン酸による分化誘導、スタウロスポリンによるアポトーシス誘導には影響を及ぼさなかったが、ADP の増殖促進作用を有していた。

・NA の ADP 増殖促進作用はβ_2-AR を介する作用であった。

・4 種の抗うつ薬 SSRI (fluoxetine)、三環系抗うつ薬 (imipramine)、NA 選択的再取り込み阻害薬 (reboxetine)、モノアミン酸化酵素阻害薬 (tranylcypromine) 及び 5-HT は、いずれも ADP の増殖、レチノイン酸による分化誘導、スタウロスポリンによるアポトーシス誘導に影響を及ぼさなかった。

本研究結果は、海馬歯状回の early progenitor cells を NA がβ_2-AR 刺激を介して、増殖促進させることを示唆するものである。従って、抗うつ薬は、脳内 NA 濃度を増加させ、海馬歯状回の early progenitor cells 上の β_2-AR を刺激して early progenitor cells を増殖促進させることによって海馬神経新生を促進させている可能性が示唆された。

今後は、*in vivo* でβ_2-AR 刺激により海馬神経新生が促進されるかどうか、さらには神経新生促進を介した抗うつ作用が認められるかどうかといった研究が必要と考えられる。また、ADP はβ_2-AR 刺激により増殖促進されたが、その下流の作用メカニズムを明らかにすることにより、神経新生促進のメカニズムがより明らかになると共に新規抗うつ薬のターゲット分子発見に繋がることも期待される。

謝辞

本研究に際しまして、終始懇切な御指導と御鞭撻を賜りました北海道大学大学院医学研究科精神医学分野 小山司教授に謹んで感謝の意を表します。また、直接御指導を賜り多くの有益な御助言をいただいた北海道大学大学院医学研究科精神医学分野 中川伸講師に心から感謝の意を表します。さらに、終始有益な御助言をいただきました北海道大学大学院医学研究科精神医学分野 井上猛講師ならびに朴秀賢助教に深く感謝いたします。

本研究にご協力いただきました加藤亜希子氏、木原舞氏、西川弘之博士、高村直樹修士に感謝いたします。

引用文献

1. Abercrombie ED, Keller RW Jr, Zigmond MJ. (1988). Characterization of hippocampal norepinephrine release as measured by microdialysis perfusion: pharmacological and behavioral studies. Neuroscience *27*, 897-904.

2. Airan RD, Meltzer LA, Roy M, Gong Y, Chen H, Deisseroth K. (2007). High-speed imaging reveals neurophysiological links to behavior in an animal model of depression. Science *317*, 819-823.

3. Babu H, Cheung G, Kettenmann H, Palmer TD, Kempermann G. (2007). Enriched monolayer precursor cell cultures from micro-dissected adult mouse dentate gyrus yield functional granule cell-like neurons. PLoS One *2*, e388.

4. Banasr M, Hery M, Printemps R, Daszuta A. (2004). Serotonin-induced increases in adult cell proliferation and neurogenesis are mediated through different and common 5-HT receptor subtypes in the dentate gyrus and the subventricular zone. Neuropsychopharmacology. *29*, 450-460.

5. Benninghoff J, Gritti A, Rizzi M, Lamorte G, Schloesser RJ, Schmitt A, Robel S, Genius J, Moessner R, Riederer P, Manji HK, Grunze H, Rujescu D, Moeller HJ, Lesch KP, Vescovi AL. (2010). Serotonin depletion hampers survival and proliferation in neurospheres derived from adult neural stem cells. Neuropsychopharmacology *35*, 893-903

6. Boku S, Nakagawa S, Masuda T, Nishikawa H, Kato A, Kitaichi Y, Inoue T, Koyama T. (2009). Glucocorticoids and lithium reciprocally regulate the proliferation of adult dentate gyrus-derived neural precursor cells through GSK-3β and β-catenin/ TCF pathway. Neuropsychopharmacology *34*, 805-815.

7. Brezun JM, Daszuta A. (1999). Depletion in serotonin decreases neurogenesis in the dentate gyrus and the subventricular zone of adult rats. Neuroscience *89*, 999-1002.

8. DeVane CL. (1999). Metabolism and pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors. Cellular and Molecular Neurobiology *19*, 443-466.

9. Dranovsky A, Hen R. (2006). Hippocampal neurogenesis: regulation by stress and antidepressants. Biol. Psychiatry *59*, 1136-1143.

10. Duman RS, Malberg J, Nakagawa S. (2001). Regulation of Adult Neurogenesis by Psychotropic Drugs and Stress. J Pharmacol Exp Ther *299*, 401-407.

11. Encinas JM, Vaahtokari A, Enikolopov G. (2006). Fluoxetine targets early progenitor cells in the adult brain. Proc Natl Acad Sci USA *103*, 8233-8238.

12. Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. Nat Med *4*, 1313-1317.

13. Fuller RW. (1994). Uptake inhibitors increase extracellular serotonin concentration measured by brain microdialysis. Life Sci *55*, 163-167.

14. Gage FH. (2000). Mammalian neural stem cells. Science *287*, 1433-1438.

15. Gould E, McEwen BS, Tanapat P, Galea LAM, Fuchs E. (1997). Neurogenesis in dentate gyrus of adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. J Neurosci *17*, 2492-2498.

16. Greene J, Banasr M, Lee B, Warner-Schmidt J, Duman RS. (2009). Vascular endothelial growth factor signaling is required for the behavioral actions of antidepressant treatment: pharmacological and cellular characterization. Neuropsychopharmacology *34*, 2459-2468.

17. Hisaoka K, Nishida A, Koda T, Miyata M, Zensho H, Morinobu S, Ohta M, Yamawaki S. (2001). Antidepressant drug treatments induce glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) synthesis and release in rat C6 glioblastoma cells. J Neurochem *79*, 25-34.

18. Hoyer D, Hannon JP, Martin GR. (2002). Molecular pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. Pharmacol Biochem Behav *71*, 533-554.

19. Jhaveri DJ, Mackay EW, Hamlin AS, Marathe SV, Nandam LS, Vaidya VA, Bartlett PF (2010). Norepinephrine directly activates adult hippocampal precursors via beta3-adrenergic receptors. J Neurosci *30*, 2795-2806.

20. Karson CN, Newton JE, Livingston R, Jolly JB, Cooper TB, Sprigg J, Komoroski RA (1993). Human brain fluoxetine concentrations. J Neuropsychiatry Clin Neurosci *5*, 322-329.

21. Kelly MW, Perry PJ, Holstad SG, Garvey MJ (1989). Serum fluoxetine and norfluoxetine concentrations and antidepressant response. Ther Drug Monit *11*, 165-170.

22. Kempermann G, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G (2004). Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. Trends Neurosci *27*, 447-452.

23. Kempermann G, (2006). Adult Neurogenesis (Oxford University Press).

24. Kessler RC, Berglund P, Demler O, Jin R, Koretz D, Merikangas KR, Rush AJ, Walters EE, Wang PS (2003). The epidemiology of major depressive disorder: results from the National Comorbidity Survey Replication (NCS-R). JAMA *289*, 3095-3105.

25. Krause M, Jia Y (2005). Serotonergic modulation of carbachol-induced rhythmic activity in hippocampal slices. Neuropharmacology *48*, 381-390.

26. Kreiss DS, Lucki I (1995). Effects of acute and repeated administration of antidepressant drugs on extracellular levels of 5-hydroxytryptamine measured in vivo. J Pharmacol Exp Ther *274*, 866-876.

27. Kulkarni VA, Jha S, Vaidya VA (2002). Depletion of norepinephrine decreases the proliferation, but does not influence the survival and differentiation, of granule cell progenitors in the adult rat hippocampus. Eur J Neurosci *16*, 2008-2012.

28. Lai M, McCormick JA, Chapman KE, Kelly PA, Seckl JR, Yau JL (2003). Differential regulation of corticosteroid receptors by monoamine neurotransmitters and antidepressant drugs in primary hippocampal culture. Neuroscience *118*, 975-984.

29. Lecrubier Y, Puech AJ, Jouvent R, Simon P, Widlocher D (1980). A beta adrenergic stimulant (salbutamol) versus clomipramine in depression: a controlled study. Br J Psychiatry *136*, 354-358.

30. Lerer B, Ebstein RP, Belmaker RH (1981). Subsensitivity of human beta-adrenergic adenylate cyclase after salbutamol treatment of depression. Psychopharmacology (Berl) *75*, 169-172.

31. Malberg J, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS (2000). Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. J Neurosci *20*, 9104-9110.

32. Mokler DJ, Torres OI, Galler JR, Morgane PJ (2007). Stress-induced changes in extracellular dopamine and serotonin in the medial prefrontal cortex and dorsal hippocampus of prenatally malnourished rats. Brain Res *1148*, 226-233.

33. Moresco RM, Colombo C, Fazio F, Bonfanti A, Lucignani G, Messa C, Gobbo C, Galli L, Del Sole A, Lucca A, Smeraldi E. (2000). Effects of fluvoxamine treatment on the in vivo binding of [F-18]FESP in drug naive depressed patients: a PET study. Neuroimage. *12*, 452-465.

34. Mueller AL, Hoffer BJ, Dunwiddie TV (1981). Noradrenergic responses in rat hippocampus: evidence for medication by alpha and beta receptors in the in vitro slice. Brain Res *214*, 113-126.

35. Nakagawa S, Kim JE, Lee R, Malberg JE, Chen J, Steffen C, Zhang YJ, Nestler EJ, Duman RS (2002). Regulation of neurogenesis in adult mouse hippocampus by cAMP and the cAMP response element-binding protein. J Neurosci *22*, 3673-3682.

36. Nicholas AP, Pieribone VA, Hökfelt T. (1993). Cellular localization of messenger RNA for beta-1 and beta-2 adrenergic receptors in rat brain: an in situ hybridization study. Neuroscience *56*, 1023-1039.

37. O'Donnell JM (1990). Behavioral effects of beta adrenergic agonists and antidepressant drugs after down-regulation of beta-2 adrenergic receptors by clenbuterol. J Pharmacol Exp Ther. *254*, 147-157.

38. Palmer TD, Markakis EA, Willhoite AR, Safar F, Gage FH. (1999). Fibroblast growth factor-2 activates a latent neurogenic program in neural stem cells from diverse regions of the adult CNS. J Neurosci *19*, 8487-8497.

39. Pälvimäki EP, Laakso A, Kuoppamäki M, Syvälahti E, Hietala J. (1994). Up-regulation of beta 1-adrenergic receptors in rat brain after chronic citalopram and fluoxetine treatments. Psychopharmacology (Berl) *115*, 543-546.

40. Pham K, Nacher J, Hof PR, McEwen BS. (2003). Repeated restraint stress suppresses neurogenesis and induces biphasic PSA-NCAM expression in the adult rat dentate gyrus. Eur J Neurosci *17*, 879-886.

41. Pupo AS, Minneman KP. (2001). Adrenergic pharmacology: focus on the central nervous system. CNS Spectr *6*, 656-662.

42. Rizk P, Salazar J, Raisman-Vozari R, Marien M, Ruberg M, Colpaert F, Debeir T (2006). The alpha2-adrenoceptor antagonist dexefaroxan enhances hippocampal neurogenesis by increasing the survival and differentiation of new granule cells. Neuropsychopharmacology *31*, 1146-1157.

43. Sacchetti G, Bernini M, Bianchetti A, Parini S, Invernizzi RW, Samanin R.

(1999). Studies on the acute and chronic effects of reboxetine on extracellular noradrenaline and other monoamines in the rat brain. Br J Pharmacol *128*, 1332-1338.

44. Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, Weisstaub N, Lee J, Duman R, Arancio O, Belzung C, Hen R. (2003). Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. Science *301*, 805-809.

45. Seaberg RM, van der Kooy D. (2002). Adult rodent neurogenic regions: the ventricular subependyma contains neural stem cells, but the dentate gyrus contains restricted progenitors. J Neurosci *22*, 1784-1793.

46. Shirayama Y, Chen AC, Nakagawa S, Russell DS, Duman RS. (2002). Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. J Neurosci. *22*, 3251-3261.

47. Strauss WL, Layton ME, Hayes CE, Dager SR. (1997). 19F magnetic resonance spectroscopy investigation in vivo of acute and steady-state brain fluvoxamine levels in obsessive-compulsive disorder. Am J Psychiatry *154*, 516-522

48. Thome J, Sakai N, Shin K, Steffen C, Zhang YJ, Impey S, Storm D, Duman RS. (2000). cAMP response element-mediated gene transcription is upregulated by chronic antidepressant treatment. J Neurosci *20*, 4030-4036.

49. Warner-Schmidt JL, Duman RS. (2006). Hippocampal neurogenesis: opposing effects of stress and antidepressant treatment. Hippocampus *16*, 239-249.

50. Warner-Schmidt JL, Duman RS. (2007). VEGF is an essential mediator of the neurogenic and behavioral actions of antidepressants. Proc Natl Acad Sci USA *104*, 4647-4652.

51. Wong EH, Sonders MS, Amara SG, Tinholt PM, Piercey MF, Hoffmann WP, Hyslop DK, Franklin S, Porsolt RD, Bonsignori A, Carfagna N, McArthur RA.

(2000). Reboxetine: a pharmacologically potent, selective, and specific norepinephrine reuptake inhibitor. Biol Psychiatry *47*, 818-829.

52. Zhang HT, Whisler LR, Huang Y, Xiang Y, O'Donnell JM. (2009).Postsynaptic alpha-2 adrenergic receptors are critical for the antidepressant-like effects of desipramine on behavior. Neuropsychopharmacology *34*, 1067-1077.