

ハロペリドール誘発心筋障害および心不全誘発
うつ様症状におけるシグマ1受容体の役割

東北大学大学院薬学研究科

薬理学分野 篠田 康晴

目次

第一章 緒言	1
第二章 ハロペリドール誘発心筋障害におけるシグマ1受容体の役割	3
2-1. 序論	
2-2. 実験結果	
2-3. 考察	
2-4. 小括	
第三章 心不全誘発うつ様症状におけるシグマ1受容体の役割	29
3-1. 序論	
3-2. 実験結果	
3-3. 考察	
3-4. 小括	
第四章 総括	59
第五章 実験方法	61
謝辞	72
参考文献	73

第一章 緒言

シグマ 1 受容体は、1970 年代よりオピオイド (SKF10047) の結合 (σ) 部位として報告されたのち (Martin WR et al., 1976)、その薬理学的特性から非オピオイド受容体に再分類されたユニークなタンパク質である (Tam SW and Cook L, 1984)。その後、ヒトをはじめとする哺乳動物のシグマ 1 受容体をコードする遺伝子 (Sigmar1) が同定、クローニングされ、哺乳動物の既知の遺伝子との相性が低い遺伝子であることが明らかにされた (Hanner M et al., 1996; Prasad PD et al., 1998; Seth P et al., 1997)。

近年の研究により、シグマ 1 受容体が小胞体膜に局在するシャペロンタンパク質として機能し、非常に多彩なタンパク質の機能や発現を調節することが明らかとなってきた (Hayashi T and Su TP, 2007; Kourrich S et al., 2012; Su TP et al., 2016)。代表的なものとして、小胞体の Ca^{2+} チャネルの inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (IP_3R) と結合し、ミトコンドリアへの Ca^{2+} 輸送を調節することや、細胞膜の様々なイオンチャネルと結合し、神経可塑性を調節することなどが報告されている。これを裏付けるかのように、シグマ 1 受容体の遺伝子欠損マウスが、うつ様症状や認知機能障害、神経性の運動障害などを呈することが報告されている (Chevallier N et al., 2011; Mavlyutov TA et al., 2010; Sabino V et al., 2009)。さらには、うつ病や統合失調症、さらには筋萎縮性側索硬化症などの患者において、シグマ 1 受容体遺伝子の遺伝子多型が報告されている (Kishi T et al., 2010; Ohi K et al., 2011; Ullah MI et al., 2015)。

一方で、シグマ 1 受容体は受容体としての性質を持ち、非常に多彩な薬剤や化合物がアゴニストやアンタゴニストとして働くことが報告されている (Su

TP et al., 2010)。それらの中には、抗うつ薬として代表的な選択的セロトニン再取り込み阻害薬 (selective serotonin reuptake inhibitor; SSRI) のフルボキサミンや抗精神病薬として代表的なハロペリドールなどがあり、前述のシグマ 1 受容体遺伝子の多型との関連は非常に興味深い。

当研究室ではこれまで、心肥大・心不全病態モデルに対するシグマ 1 受容体アゴニストの心保護作用について数多くの報告を行ってきた (Bhuiyan MS et al., 2009, 2010; Tagashira H et al., 2010, 2011, 2013b, 2013c, 2014)。このような背景から、心疾患病態や神経疾患におけるシグマ 1 受容体の役割をさらに明らかにするため、①心不全病態に対するアンタゴニスト、ハロペリドールの作用、②心不全誘導うつ病におけるシグマ 1 受容体の役割、以上の二点を研究課題とした。

第二章

ハロペリドール誘発心筋障害におけるシグマ 1 受容体の役割

2-1. 序論

ハロペリドールは、抗精神病薬として統合失調症やせん妄などに広く使用される薬剤である。その作用機序の代表的なものとして、ドパミン D2 受容体に対する強力な阻害作用（解離定数 $K_i = 2.8 \text{ nM}$ ）が挙げられる（Bowen WD et al., 1990）。一方で、ハロペリドールはシグマ 1 受容体に対しても同等の強力な阻害作用（ $K_i = 2.7 \sim 3.0 \text{ nM}$ ）を持つ（Bowen WD et al., 1990; Matsumoto RR and Pouw B, 2000）。さらには、モルモットやヒト神経芽細胞株において、還元型ハロペリドールがシグマ 1 受容体を不可逆的に阻害するといった報告もなされている（Cobos EJ et al., 2007）。これらの報告から、シグマ 1 受容体が、従来から広く知られているハロペリドールの作用点ではないものの、重要な標的であると考えられる。

シグマ 1 受容体は、小胞体膜に局在するシャペロンタンパク質である。小胞体の中でも特にミトコンドリアに接する領域 [mitochondrial-associated endoplasmic reticulum (ER) membrane (MAM)] に豊富に存在し、 IP_3R と結合することで、ミトコンドリアへの Ca^{2+} 輸送を調節する（Hayashi T and Su TP, 2007）。当研究室ではこれまで、心不全病態において左心室におけるシグマ 1 受容体の発現が低下し、 IP_3R を介する Ca^{2+} 放出の異常が生じること、さらには、シグマ 1 受容体アゴニストがこれらを改善することを報告してきた（Tagashira H et al., 2013a; Tagashira H et al., 2014）。しかし、ハロペリドールによるシグマ 1 受容体の不活性化／発現低下が心筋細胞における細胞内 Ca^{2+} 動態にどういった影響を及ぼすのか、また心肥大・心不全にどういった影響を及ぼすのかは

明らかでないため、本研究の検討課題とした。

2-2. 実験結果

2-2-1. TAC マウスの病態に対するハロペリドールおよびピルビン酸の慢性投与の効果

圧負荷心不全モデルである TAC マウスを用いて、ハロペリドールの *in vivo* における心毒性を検討した。TAC 処置後、2 日目から 13 日目までハロペリドール (Halo, 0.1 mg/kg/day) およびピルビン酸 (Pyr, 1 mg/kg/day) の経口投与を行い、14 日目に心臓および肺の摘出、重量測定、および心室組織のサンプリングを行った。体重 (BW) に対する心臓および肺の重量 (それぞれ HW/BW、LW/BW)、心不全病態のマーカーとして知られる ANP 遺伝子の心室における発現量の測定した (Fig. 1A-C)。さらに、マッソーントリクローム染色により、心組織の線維化を検討した (Fig. 1D)。Sham マウス非投与群と比較して TAC マウス非投与群では、HW/BW および ANP mRNA 発現量が有意に上昇した (Fig. 1A, C)。これは、TAC 後 14 日目において心肥大が生じていることを示している。また、ピルビン酸の投与により、TAC マウスで増加した HW/BW および ANP mRNA 発現量が有意に低下した (Fig. 1A, C; $P < 0.01$ vs. TAC vehicle)。一方、TAC マウス Halo 投与群では、これらの値に加え LW/BW が顕著に増大した (Fig. 1B; $P < 0.01$ vs Sham vehicle, $P < 0.05$ vs. TAC vehicle)。LW/BW の値は、心機能の低下により肺がうっ血を起こすことで上昇することから、TAC マウス Halo 投与群では心機能が低下していることが示唆された。また、ハロペリドールとピルビン酸を併用することにより、TAC マウス Halo 投与群と比較して、HW/BW、LW/BW および ANP mRNA 発現量が顕著に低下した (Fig. 1A-C)。さらに、マッソーントリクローム染色の結果、TAC マウス Halo 投与群の心室では、線維化を起こしていると考えられる濃い紫色に染まった様子が観察された (Fig. 1D)。

次に、心エコーにより心機能の評価を行った (Fig. 2)。心室が拍動する典型的な様子を Fig. 2A に示した。これらのデータから方法の項 (第五章) の記載のとおり、収縮の度合いを示す FS、ポンプ機能の指標となる EF および左室収縮末期径 LVESD を算出した (Fig. 2B-D)。その結果、TAC マウス Halo 投与群において、FS および EF が顕著に低下した ($P < 0.01$ vs. Sham vehicle)。また、ピルビン酸の併用投与により FS および EF の低下は有意に改善した ($P < 0.01$ vs. TAC Halo)。これらの結果は、ハロペリドールの投与が TAC マウスの病態を増悪すること、また、このようなハロペリドールの作用はピルビン酸の併用投与により改善されることを示している。

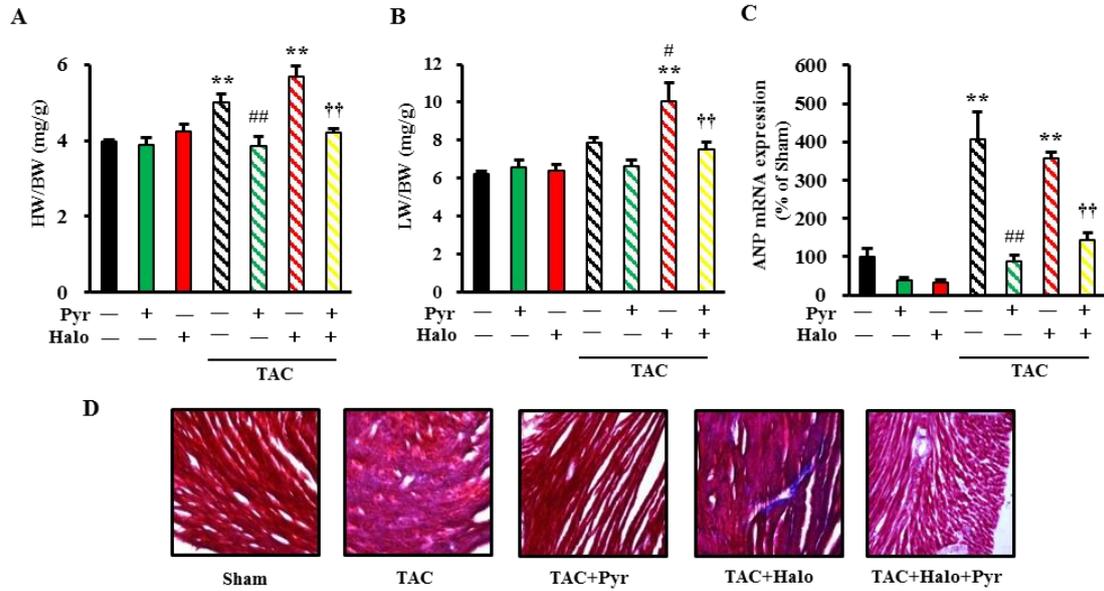


Fig. 1: Effects of haloperidol and sodium pyruvate administration on cardiac hypertrophy and function in TAC mice.

A: TAC-induced cardiac hypertrophy, as indicated by the heart weight/body weight (HW/BW) ratio. $F(6, 17) = 14.409$, $P < 0.01$. B: TAC-induced cardiac hypertrophy, as indicated by the lung weight/body weight (LW/BW) ratio.

Halo (0.1 mg/kg) and/or sodium pyruvate (1 mg/kg; Pyr) were administered to sham and TAC mice for 2 weeks after surgery. $F(6, 18) = 7.425$, $P < 0.01$.

C: Effect of Halo and Pyr treatment on ANP mRNA levels in TAC and control mice. $F(6, 55) = 24.810$, $P < 0.01$. D: Effect of Halo and Pyr on scar formation induced by TAC (Masson's trichrome staining). Each column represents the mean \pm S.E.M.

** $P < 0.01$ versus sham/vehicle-treated group; # $P < 0.05$

and ## $P < 0.01$ versus TAC/vehicle-treated group; †† $P < 0.01$ versus

TAC/Halo-treated group.

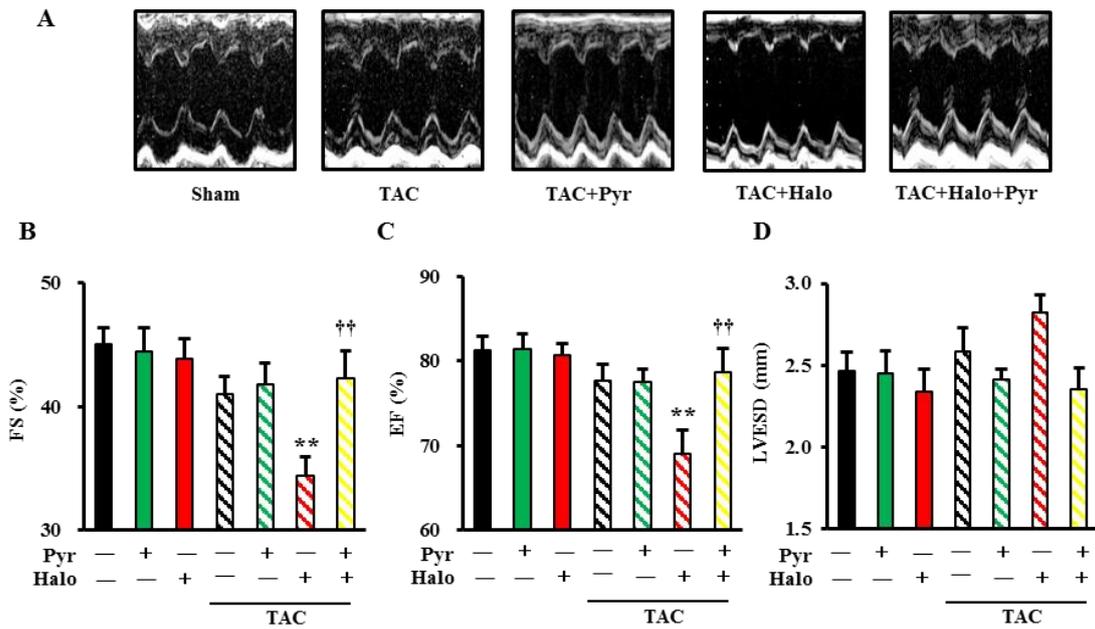


Fig. 2: Effects of haloperidol and sodium pyruvate administration on cardiac function in TAC mice.

A: Representative M-mode echocardiograms of TAC mice treated with and without Halo and Pyr. B: Changes in percentage of LV fractional shortening (FS). $F(6, 43) = 3.804$, $P < 0.01$. C: Changes in percentage of ejection fraction (EF). $F(6, 44) = 3.934$, $P < 0.01$. D: Changes in left ventricular end-systolic diameter (LVESD). $F(6, 44) = 1.961$, $P = 0.0920$. Groups consist of 5-9 mice. Each column represents the mean \pm S.E.M. **, $P < 0.01$ versus sham/vehicle-treated group; ††, $P < 0.01$ versus TAC/Halo-treated group.

2-2-2. TAC マウスの心臓に対するハロペリドールおよびピルビン酸の慢性投与の効果 —生化学的解析および生存率の検討—

次に、マウス左心室におけるシグマ 1 受容体の発現量を免疫ブロットにより検討した (Fig. 3A, B)。結果として、TAC マウス Halo 投与群において発現量が顕著に減少した ($P < 0.01$ vs. Sham vehicle)。また、興味深いことにピルビン酸の併用投与は、シグマ 1 受容体発現量の低下を改善しなかった ($P < 0.05$ vs. Sham vehicle)。さらに、左心室の ATP 含量を測定した結果、TAC マウス Halo 投与群の左心室組織で顕著な ATP 含量の低下が観察された (Fig. 3C; $P < 0.01$ vs. TAC vehicle)。一方で、TAC マウス Halo+Pyr 併用投与群では、有意に改善した ($P < 0.05$ vs. TAC Halo)。この結果と一致して、28 日間の投与期間におけるマウスの生存率を解析したところ、TAC マウス Halo 投与群は vehicle 投与群と比較して生存率が有意に低下した一方で ($P < 0.05$)、Pyr の併用投与により改善した ($P < 0.05$ vs. TAC Halo)。

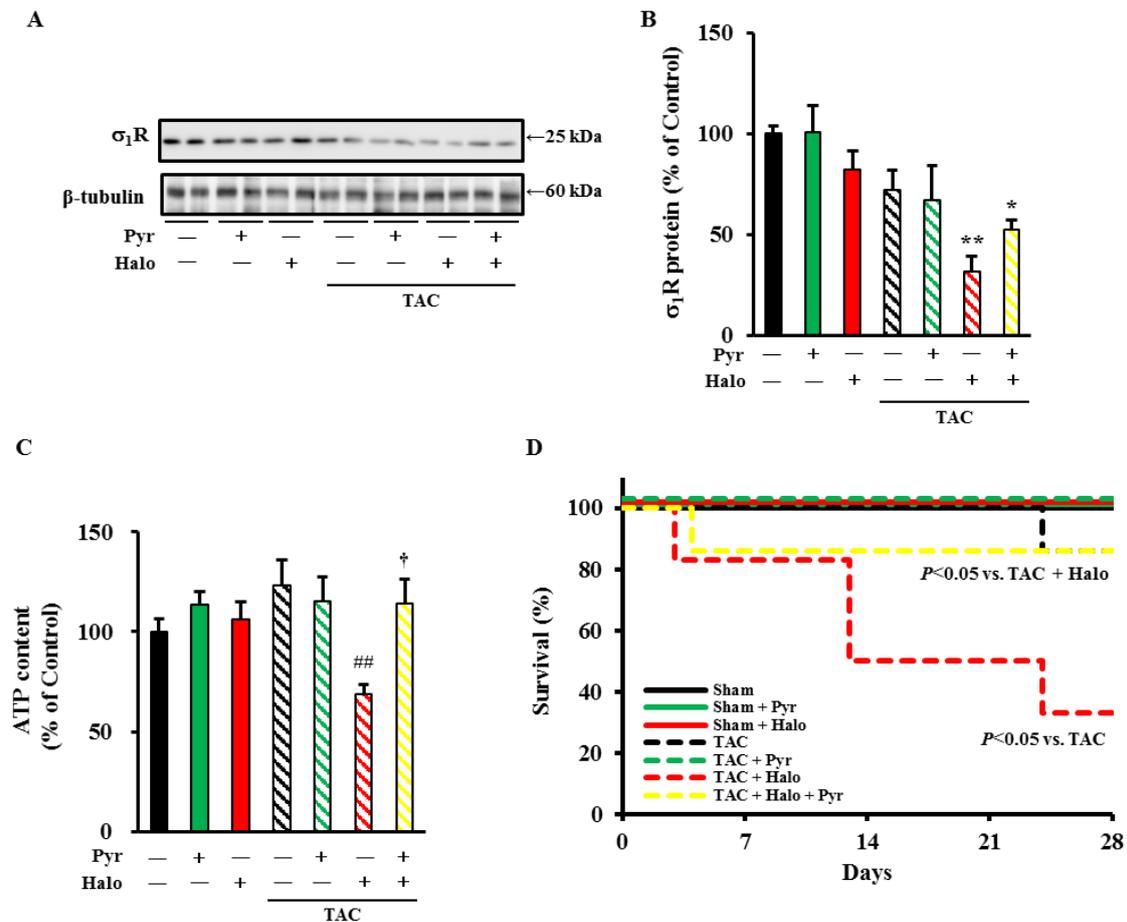


Fig. 3: Effects of combining haloperidol with sodium pyruvate treatment on cardiac σ_1R expression, ATP content and survival in TAC mice

A: Western blot analysis of σ_1R protein in the LV of sham and TAC mice, with or without drug treatment. Anti- β -tubulin staining serves as a loading control. **B:** Quantification by densitometry of σ_1R immunoreactive bands. $F(6, 19) = 6.005$, $P < 0.01$. **C:** ATP content in left ventricles with or without drug treatment. $F(6, 34) = 3.436$, $P < 0.01$. *, $P < 0.05$ and **, $P < 0.01$ versus sham/vehicle-treated group; ##, $P < 0.01$ versus TAC/vehicle-treated group; †, $P < 0.05$ versus TAC/Halo-treated group. **D:** Kaplan-Meier survival analysis following Halo and Pyr treatment of TAC mice. Halo and/or Pyr or saline along were administered once daily to sham and TAC mice and survival was monitored over 28 days. In the Log-rank test: $P < 0.05$ for TAC/Halo versus TAC/vehicle-treated group; $P < 0.05$ for TAC/Halo/Pyr-treated group versus TAC/Halo-treated group.

2-2-3. 初代培養心筋細胞を用いた作用機序の検討

in vivo で見られたハロペリドールが有する毒性の作用機序について、初代培養心筋細胞を用いて検討した (Fig. 4)。まず、内因性の心肥大促進因子として知られるアンギオテンシン II (Ang II; 100 nM) とハロペリドール (10 nM) で 48 時間刺激したのち、Alexa Fluor 488-phalloidin を用いて細胞骨格のアクチン線維を染色した (Fig. 4A, left panel)。これらの染色像から、細胞の面積を定量し比較した結果を Fig. 4B に示す。結果として、ハロペリドールの単独処置は Ang II とほぼ同程度まで細胞の肥大化を引き起こし ($P < 0.05$ vs. control)、これらの共処置はさらに顕著な効果を示した ($P < 0.05$ vs. Halo, Ang II)。また、高容量のシグマ 1 受容体アゴニスト SA4503 (10 μ M) をハロペリドールあるいは Ang II とともに処置することで、これら単独処置による肥大作用は消失した ($P < 0.05$ vs Halo; $P < 0.01$ vs. Ang II)。これらの結果から、ハロペリドールはシグマ 1 受容体の阻害を介し、心筋細胞の肥大化を誘導することが示唆された。

次に、ミトコンドリア染色プローブ (MitoTracker CMXRos) で同様の心筋細胞の染色を行った。ミトコンドリアは、電子伝達系と呼ばれる内膜に存在するタンパク質複合体により、内側のマトリクスから外側の膜間腔へプロトンが輸送されている。この内膜を介したプロトンの濃度勾配 (膜電位) を利用して、ATP が合成される。言い換えれば、膜電位はミトコンドリアにおける ATP 合成に必要不可欠である。今回用いている染色プローブはカチオン性で、電位的に負のミトコンドリア内腔のマトリクスへと集積する。この性質から、プローブのミトコンドリアへの取り込み量から、膜電位を推定することができる。そこで、染色像からプローブの蛍光強度を算出し、比較した (Fig. 4A, C)。結果として、ハロペリドール、Ang II それぞれ単独処置をした細胞および共処置した細胞のすべてにおいて、蛍光強度が顕著に低下した。この結果は、ハロペリド

ールの処置がミトコンドリア膜電位の形成に対して障害を与えることを示唆している。

TAC マウス Halo 投与群の心左心室においてシグマ 1 受容体の発現量が低下していたことから、初代培養心筋細胞において同様の検討を行った (Fig. 5A)。結果として、ハロペリドールの単独処置は影響を与えず、Ang II と共処置した細胞においてのみ発現量が有意に低下した ($P < 0.05$ vs. control)。また、代表的な細胞死であるアポトーシスを TUNEL 染色により検討したところ、ハロペリドール単独処置は TUNEL 陽性細胞を有意に増加させ ($P < 0.05$ vs. control)、Ang II との共処置によりさらに顕著に増大した ($P < 0.01$ vs. Halo)。

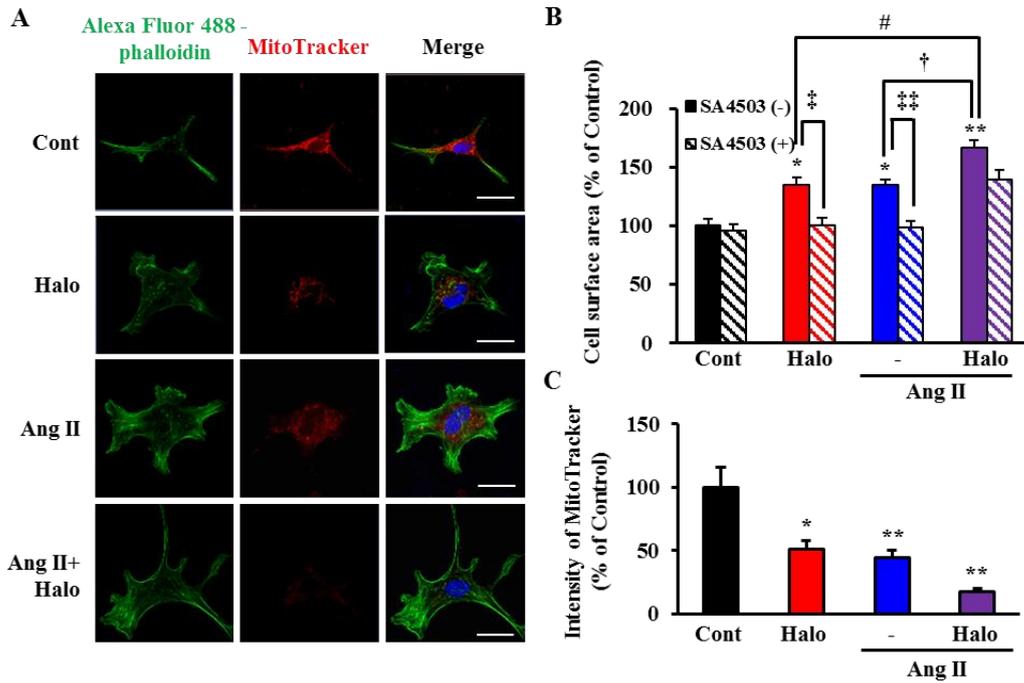


Fig. 4: Effects of haloperidol treatment on Ang II-induced hypertrophy and mitochondrial membrane potential in cultured cardiomyocytes.

A: Cells were stained with Alexa Fluor 488-phalloidin (green), Mito Tracker Red CMXRos (red) and DAPI (blue) and assessed by fluorescence microscopy. B: Cell size is expressed as a percentage of surface area relative to untreated control cells. Fifty cells were counted in each experiment. $F(7, 408) = 18.680$, $P < 0.01$. C: Mito Tracker Red CMXRos intensity is expressed as a percentage of surface area relative to untreated control cells. Six to nine randomly selected fields were counted in each experiment. $F(3, 26) = 10.430$, $P < 0.01$. Data are expressed as percentages of control values (mean \pm S.E.M.). *, $P < 0.05$ and **, $P < 0.01$ versus control cells; #, $P < 0.05$ versus Halo-treated cells; †, $P < 0.05$ versus Ang II-treated cells; ‡, $P < 0.05$ and ‡‡, $P < 0.01$ versus SA4503 (-) control.

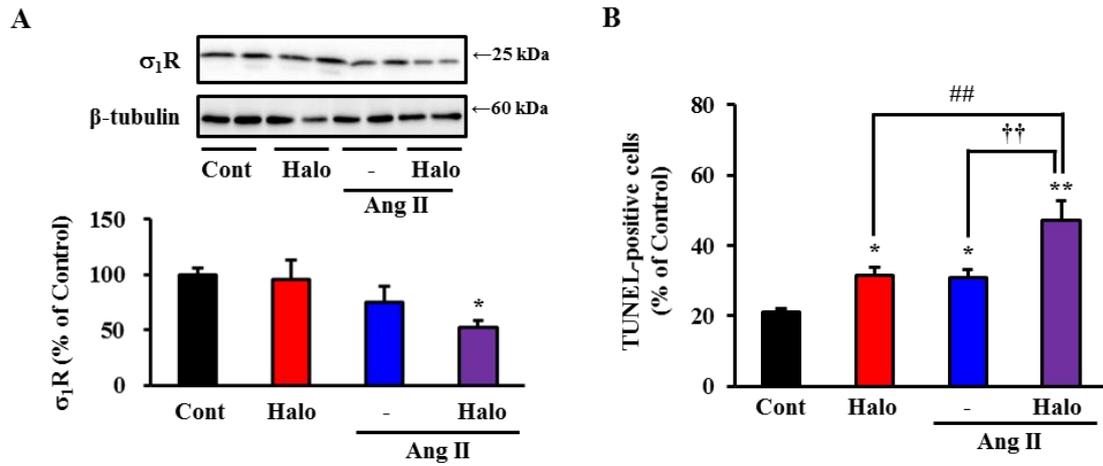


Fig. 5: Effects of haloperidol treatment on σ_1R protein levels and apoptosis in cultured cardiomyocytes.

A: Upper, Immunoblot of σ_1R protein in NRVMs treated 48 hr with or without Ang II or haloperidol (Halo). β -tubulin staining serves as a loading control. Lower, Densitometry analysis of σ_1R immunoreactive bands. Groups consist of 4 samples. B: TUNEL-positive cells were counted in cultures treated 48 hours with or without Ang II or Halo. Eighty cells from 10 randomly selected fields were counted in each experiment. $F(3, 19) = 3.086$, $P < 0.05$. Data are expressed as percentages of control values (mean \pm S.E.M.). *, $P < 0.05$ versus control cells; ##, $P < 0.01$ versus Halo-treated cells; ††, $P < 0.01$ versus Ang II-treated cells.

2-2-4. ハロペリドールが細胞内 Ca^{2+} 動態に与える効果の検討

次に、小胞体からミトコンドリアおよび細胞質への Ca^{2+} 放出に対するハロペリドールの効果を検討した (Fig. 6)。ミトコンドリアの Ca^{2+} レベルは、ミトコンドリア移行配列を付加した pericam (ratiometric pericam-mt) を細胞に発現させることで測定した。細胞質の Ca^{2+} レベルは Fura-2 AM を用いて測定した。細胞をフェニレフリン (phenylephrine; PE) や ATP といった細胞膜の Gq 結合型 GPCR を活性化する分子で刺激すると、小胞体の IP_3 受容体が活性化され、 Ca^{2+} が放出される。これにより、ミトコンドリアおよび細胞質の Ca^{2+} レベルが一過性に上昇する (Fig. 6A, C and E)。これらのピーク幅を算出し、グラフにした (Fig. 6B, D and F)。結果として、ハロペリドールを 48 時間処置した細胞では、PE 刺激によるミトコンドリアへの Ca^{2+} 移行が有意に低下した (Fig. 6B; $P < 0.01$ vs. control)。また、Ang II との共処置した細胞では、より顕著に低下した ($P < 0.05$ vs. Halo)。一方で、ハロペリドールと Ang II を共処置した細胞では、細胞質への Ca^{2+} 放出が有意に増大した (Fig. 6D; $P < 0.01$)。ハロペリドールと Ang II の共処置した細胞では、ATP 刺激によるミトコンドリアへの Ca^{2+} 移行も PE と同様に顕著に低下した (Fig. 6F)。さらに、ハロペリドールと Ang II の共処置は、ATP 含量を著しく低下させた (Fig. 6G)。

次に、ハロペリドールによる小胞体からミトコンドリアへの Ca^{2+} 輸送障害におけるシグマ 1 受容体の関与を検討するため、シグマ 1 受容体アゴニスト SA4503 を用いて実験を行った (Fig. 7)。ハロペリドールを 1 時間処置した細胞では、ATP 刺激に伴うミトコンドリアへの Ca^{2+} 輸送が著しく減少し (Fig. 7B)、一方で細胞質への Ca^{2+} 輸送が顕著に増大した (Fig. 7D)。これらのようなハロペリドールの作用は、SA4503 の共処置によりほぼ完全に消失した。これらの結果から、ハロペリドールはシグマ 1 受容体の阻害を介し、細胞内 Ca^{2+} 動態に障害

を与えることが明らかとなった。

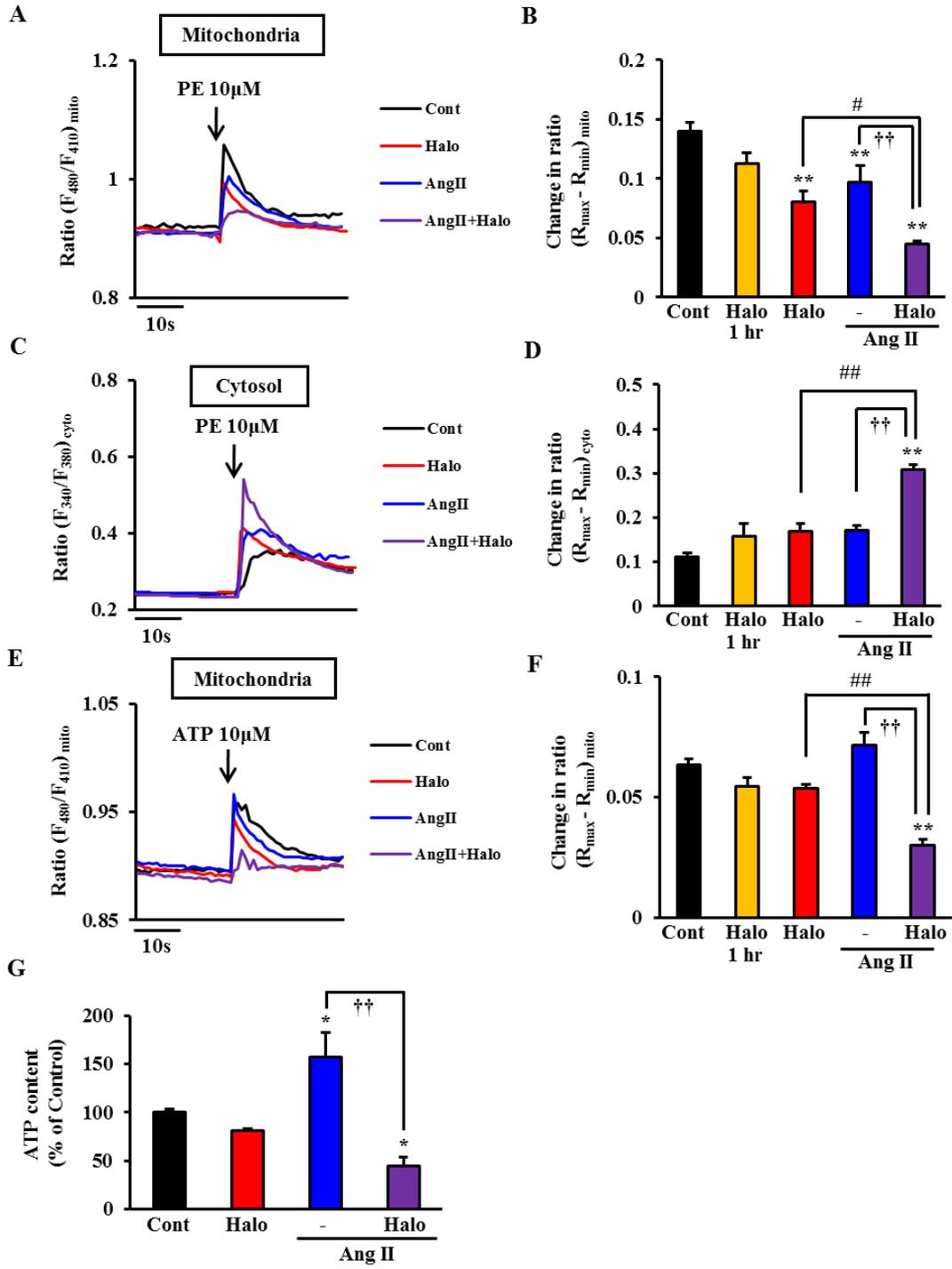


Fig. 6: Effects of haloperidol treatment on phenylephrine (PE) and ATP-induced Ca²⁺ influx into mitochondria and the cytosol and on ATP content.

A: Time course of PE-induced Ca²⁺ influx into mitochondria treated 48 hr with or without Ang II or Halo. B: Peak increases in [Ca²⁺]_{mito} induced by 10 μM PE. $F(4, 96) = 14.392$, $P < 0.01$. C: Time courses of PE-induced Ca²⁺ release into the cytosol in cells treated 48 hr with or without Ang II or Halo. D: Peak increases in [Ca²⁺]_{cyto} induced by 10 μM PE. $F(4, 89) = 16.579$, $P < 0.01$. E: Time course of ATP-induced Ca²⁺ influx into mitochondria in cells treated 48 hr with or without Ang II. F: Peak increases in [Ca²⁺]_{mito} induced by 10 μM ATP. Each group consists of >10 cells. $F(4, 101) = 20.761$, $P < 0.01$. G: Measurement of cellular ATP content with or without AngII or Halo treatment. Groups consist of 3-4 samples. $F(3, 22) = 9.870$, $P < 0.01$. Data are expressed as percentages of control cell value (mean ± S.E.M.). *, $P < 0.05$ and **, $P < 0.01$ versus control cells; #, $P < 0.05$ and ##, $P < 0.01$ versus Halo-treated cells; ††, $P < 0.01$ versus Ang II-treated cells.

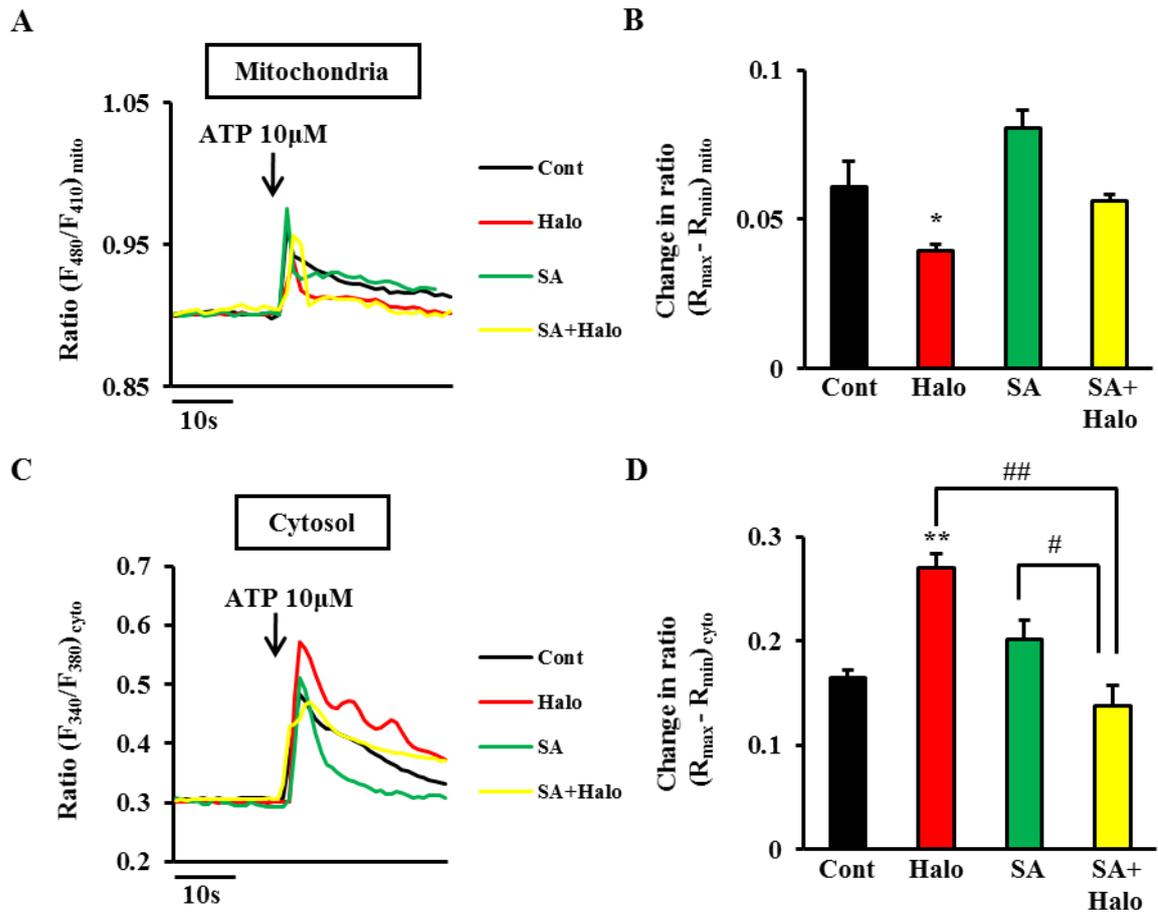


Fig. 7: Effects of acute haloperidol or SA4503 treatment on ATP-induced Ca^{2+} mobilization into mitochondria and the cytosol.

A: Time course of ATP-induced Ca^{2+} influx into mitochondria in cardiomyocytes treated with or without Halo or SA4503 (SA) for 1 hr. B: Peak increases in $[Ca^{2+}]_{mito}$ induced by 10 μ M ATP. $F(3, 71) = 4.281$, $P < 0.01$. C: Time courses of ATP-induced Ca^{2+} release to the cytosol. D: Peak increases in $[Ca^{2+}]_{cyto}$ induced by 10 μ M ATP. Groups consist of >10 cells. $F(3, 55) = 7.789$, $P < 0.01$. Data are expressed as percentages of control value (mean \pm S.E.M.). *, $P < 0.05$ and **, $P < 0.01$ versus control cells; #, $P < 0.05$ and ##, $P < 0.01$ versus Halo-treated cells.

2-2-5. ハロペリドールがオートファジーに与える効果の検討

これまで、肥大化した心臓や心不全を起こした心臓、さらには心虚血の病態などにおいてオートファジーの異常が生じることが報告されている

(Dammrich J and Pfeifer U, 1983; Nakai A et al., 2007; Yan L et al., 2005)。そこで、ハロペリドールと Ang II の処置がオートファジーに与える効果を検討した (Fig. 8)。48 時間処置したのち、抗 LC3 抗体および抗 cytochrome c 抗体を用いて免疫染色を行った (Fig. 8A)。ハロペリドールおよび Ang II を共処置した心筋細胞では、オートファゴソームと考えられるドット状の染色像が見られ (Fig. 8A)、さらには蛍光強度の著しい増大が生じた (Fig. 8B; $P < 0.01$)。ミトコンドリアタンパク質の cytochrome c の染色では、対照群の細胞ではミトコンドリア様の網目状の構造をなしていた一方、共処置した細胞では断片化を起こしたと考えられる細かい小胞状の構造をなしていた。また、それらは LC3 ドットの一部と共局在したことから、異常なミトコンドリアを分解するマイトファジーが生じていることが示唆された。さらには、LC3 と同様にオートファジーのマーカーとして知られる p62 の上昇した細胞が見られた (Fig. 8C)。

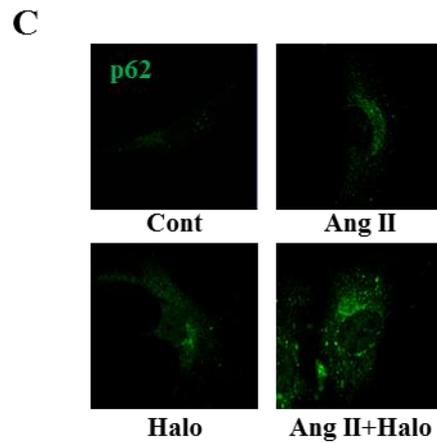
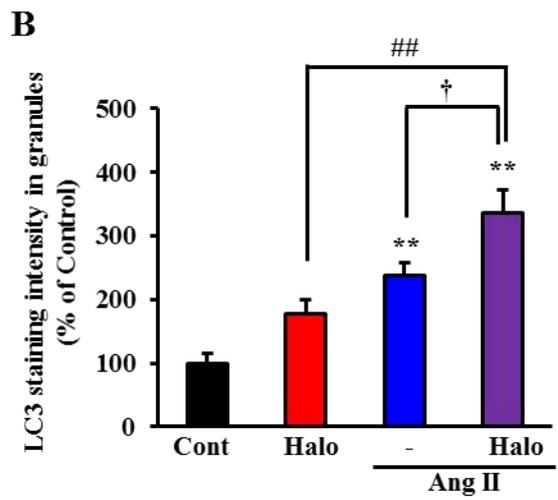
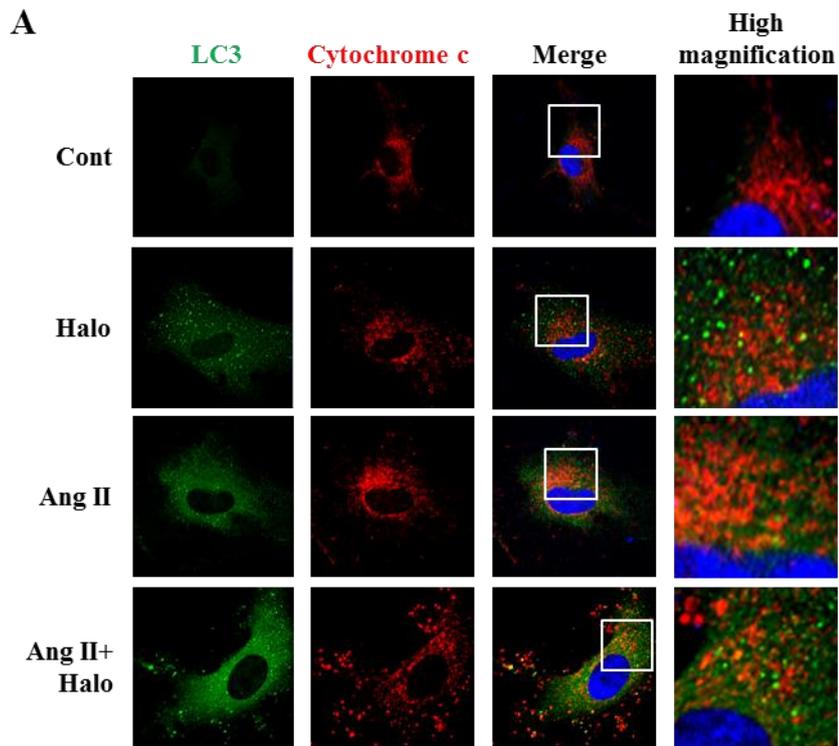


Fig. 8: Effects of haloperidol treatment on autophagy.

A: Cultured cardiomyocytes were assessed using antibodies to LC3 (a marker of autophagy; green) and Cytochrome c (a mitochondrial marker; Red) and to DAPI (blue) as a nuclear stain. B: Intensity of LC3 staining in granules is expressed as a percentage relative to control cells. Six to nine randomly selected fields were counted in each experiment. $F(3, 23) = 13.575$, $P < 0.01$. C: Cultured cardiomyocytes were assessed using antibodies to p62 (a marker of autophagy; green). Data are expressed as percentages of control values (mean \pm S.E.M.). **, $P < 0.01$ versus control cells; ##, $P < 0.01$ versus Halo-treated cells; †, $P < 0.05$ versus Ang II-treated cells.

2-2-6. ハロペリドールがミトコンドリアタンパク質の発現量に与える効果の検討

ここまでの初代培養心筋細胞を用いた検討から、ハロペリドールと Ang II の共処置は、Ca²⁺動態の異常を引き起こすことで、ミトコンドリアの機能異常や細胞死を引き起こすことが明らかとなった。またマイトファジーにより、障害を受けたミトコンドリアの分解が生じていることが示唆された。そこで、ミトコンドリアタンパク質の Voltage-dependent anion-selective channel protein 1 (VDAC) の発現量を免疫ブロットで検討した (Fig. 9)。その結果、ハロペリドールと Ang II を共処置した細胞においてのみ、VDAC の発現量が有意に低下した (Fig. 9B; $P < 0.05$)。

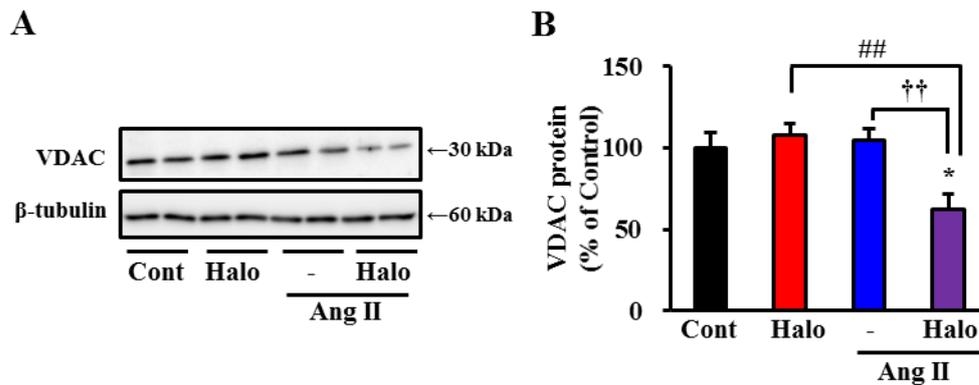


Fig. 9: Effects of haloperidol treatment on mitochondrial protein, VDAC protein levels.

A: Immunoblot of the mitochondrial protein VDAC in cultured cardiomyocytes treated with or without Ang II or Halo for 48 hr. B: Quantification by densitometry of VDAC protein. $F(3, 20) = 6.536$, $P < 0.01$. Data are expressed as percentages of control values (mean \pm S.E.M.). *, $P < 0.05$ versus control cells; ##, $P < 0.01$ versus Halo-treated cells; ††, $P < 0.01$ versus Ang II-treated cells.

2-3. 考察

当研究室はこれまで、圧負荷心肥大モデルを用いてシグマ 1 受容体アゴニストの心保護作用を検討してきた。しかし、その病態においてシグマ 1 受容体の機能がどのように障害されるか、またリガンドが存在しない場合の生体においてシグマ 1 受容体が活性化されているのか、不活性化されているのかなど、その詳細は未だに明らかとなっていない。これまで、心肥大の進展とともに、左心室におけるシグマ 1 受容体の発現が低下すること、さらにはその発現の低下が心機能の低下と非常によく相関することを報告した (Bhuiyan MS et al., 2009; Tagashira H et al., 2010)。また、シグマ 1 受容体アゴニストがげっ歯類を用いた圧負荷心肥大モデルの病態を改善することを報告した (Bhuiyan MS et al., 2011a, 2011b; Tagashira H et al., 2013a, 2013b, 2014)。本研究では、ハロペリドールによるシグマ 1 受容体の慢性的な抑制作用あるいは発現量減少作用が、心不全病態において増悪作用を引き起こすことを明らかとした。これまで様々な報告から、ハロペリドールやその代謝物がシグマ 1 受容体を不可逆的に阻害することや、長期投与が脳内シグマ 1 受容体レベルを低下させることが明らかとなっている (Cobos EJ et al., 2007; Reynolds GP et al., 1991)。今回我々は以下の点を明らかとした。①ハロペリドールの慢性投与は、心室におけるシグマ 1 受容体の発現量を低下させる。②これに伴い、心臓における ATP 含量が低下する。③結果として、TAC マウスの病態進行を悪化させ、致死率を高める。これまで我々が明らかとしてきた、シグマ 1 受容体アゴニストが ATP 産生を賦活化することを考慮すると、ハロペリドールの慢性投与による心毒性は、シグマ 1 受容体の不活性化とミトコンドリア ATP 産生の低下によるものと考えられる。

初代培養心筋細胞の TUNEL 染色により、ハロペリドールと Ang II の共処置

がアポトーシスを引き起こすことを明らかとした。また、LC3 や p62 といったオートファジーマーカーのレベルが上昇したことから、オートファジーの異常を引き起こすことも示された。さらに興味深いことに、MitoTracker の蛍光強度の低下や LC3/cytochrome c の共局在化、および VDAC の発現低下などが生じていたことから、ミトコンドリアの断片化や分解が生じていたと考えられる。これらの結果は、ミトコンドリア障害が ATP 産生の低下とともに、アポトーシスやオートファジーを誘導することを示唆している (Gomes LC et al., 2011)。また、ハロペリドール処置が Ang II 処置と同様に、ミトコンドリア膜電位を著しく低下させることを明らかとした。Ang II はマウスの心臓や血管平滑筋において NADPH オキシダーゼの活性化を介して、活性酸素 (reactive oxygen species; ROS) を産生し (Byrne JA et al., 2003; Rajagopalan S et al., 1996)、細胞内 Ca²⁺動態やミトコンドリアの機能に障害を与えることが報告されている (de Cavanagh EM et al., 2009; Goldenberg I et al., 2001.)。同様に、ハロペリドールが ROS 産生を亢進することが神経細胞を用いた検討で報告されている (Sagara Y, 1998)。

ハロペリドールが TAC マウスの生存率を著しく低下させることを明らかとした (Fig. 3D; TAC vehicle: 86% at 28 days, TAC Halo; 50% at 14 days and 33% at 28 days)。ミトコンドリアは、心筋組織のおよそ 30%を占める構成成分であり、心筋細胞で産生される ATP の 70%は収縮反応に用いられ、残りの 30%は sarcoplasmic / endoplasmic reticulum calcium ATPase (SERCA) などのイオンポンプへと供給される (Gibbs CL, 1978; Suga H, 1990)。心臓の収縮には ATP 産生が必要不可欠であり、ATP 産生が障害されると直接的に心機能の異常が生じる (Doenst T et al., 2013)。これらの知見と一致して、今回、TAC マウスに対するハロペリドールの投与が ATP 産生の低下とともに心機能障害を引き

起こすことを明らかとした。一方、Sham 群のマウスに対してハロペリドールは毒性を示さなかった。この結果は、不整脈などの循環器障害を持たない患者に対する低用量 (< 2mg/kg) の投与は、副作用を示さなかったという報告と一致している (Meyer-Massetti C et al., 2010)。

過去の臨床試験では、統合失調症患者に対しハロペリドールとともに ω -多価不飽和脂肪酸やビタミン E、C を投与することで、酸化ストレスを軽減し副作用を防ぐ試みがなされている (Sivrioglu EY et al., 2007)。今回我々はハロペリドールとともに、解糖系の産物でアセチル CoA へと変換されるピルビン酸を用いてミトコンドリア ATP 産生の賦活化を試みた。ピルビン酸は、抗酸化作用を持つことなどから、ミトコンドリア病への治療効果を期待した臨床試験が行われている (Koga Y et al., 2012; Tanaka M et al., 2007)。またピルビン酸は、ランゲンドルフを用いたラット心臓の虚血・再灌流に対して保護作用を有することが報告されている (Kerr PM et al., 1999)。興味深いことに今回、ピルビン酸とハロペリドールの併用投与は、TAC マウスの心臓における ATP 産生を賦活化することで、心肥大病態や心機能の低下を抑制し、さらには生存率の低下を改善した。一方で心不全状態を呈した拡張型心筋症患者に対してピルビン酸の冠内投与を行うことにより、心指数が増加し、肺動脈楔入圧および心拍数が低下することが報告されている (Hermann HP et al., 1999)。さらには、ピルビン酸は筋原細胞のミトコンドリアバイオジェネシスを促進することや、TCA サイクルに基質を供給し下流の電子伝達系を促進することも報告されている (Des Rosiers C et al., 2011; Wilson L et al., 2007)。

2-4. 小括

本研究では、*in vivo* および *in vitro* の実験から、ハロペリドールがストレス条件下において、心臓のシグマ 1 受容体の発現量／活性を著しく低下させることで、ミトコンドリアへの Ca^{2+} 動態に障害を与え、ATP 産生を低下させることを明らかとした。これにより、ハロペリドールは TAC マウスの心臓リモデリングの増悪や病態を悪化させ、生存率の低下を引き起こした。また今回、ピルビン酸によるミトコンドリア ATP 産生の賦活化が、ハロペリドールを投与した TAC マウスの ATP 産生減少を改善し、心機能の維持につながることを示した。これらの結果は、多量のハロペリドール投与により副作用が生じかねない重度の統合失調症患者の治療に ATP 補充療法が有効であることを示唆している。

第三章

心不全誘発うつ様症状におけるシグマ 1 受容体の役割

3-1. 序論

心不全患者におけるうつ病の発生は、循環器に対する治療効果を低下させることから、近年注目を集めている (Hasler G et al., 2004; Rumsfeld JS et al., 2003)。また、虚血性心筋梗塞後のうつ病は、罹患率が高く、致死率も高い (Taylor CB et al., 2006)。さらには、冠状動脈バイパス手術や急性心筋梗塞、慢性狭心症などの治療における現在の American College of Cardiology / American Heart Association のガイドラインでは、うつ病に対する治療を積極的に行うよう推奨されている (Rumsfeld JS and Ho PM, 2005)。しかし末梢の心臓と気分障害であるうつ病との関連は不明な部分が多く、虚血性心筋梗塞がうつ病の原因そのものであるかは明らかではない。

フルボキサミンやサートラリンなどの SSRI はシグマ 1 受容体に対する強いリガンドであり、当研究室ではこれまで、げっ歯類の圧負荷心不全モデルを用いて、シグマ 1 受容体を介する SSRI の心保護作用メカニズムを検討してきた (Bhuiyan MS et al., 2010, 2013; Tagashira H et al., 2010)。その中で、フルボキサミンとパロキセチンの二つの内、シグマ 1 受容体に対する親和性の高いフルボキサミンのみがげっ歯類を用いた心不全モデルの病態を改善することを報告した (それぞれ $K_i = 36 \text{ nM}$, 1893 nM) (Bhuiyan MS et al., 2010; Tagashira H et al., 2010)。さらに我々はこれまで、シグマ 1 受容体選択的アゴニスト SA4503 ($K_i = 4.4 \text{ nM}$) もフルボキサミン同様に心保護作用を有することを明らかにした (Tagashira H et al., 2013b)。

近年 Ito らにより、心不全を呈する圧負荷・高塩濃度食モデルマウスがうつ様

症状を呈すること、本モデルマウスの脳内シグマ 1 受容体発現量が低下することなどが報告された (Ito K et al., 2012)。またこの報告において彼らは、シグマ 1 受容体アゴニストの中枢への投与により交感神経系を抑制することで、シグマ 1 受容体発現量や心機能の低下を改善したことを示している。しかし本モデルにおいて、こういったメカニズムでシグマ 1 受容体の発現量が低下するかは明らかとなっておらず、本研究の検討課題とした。

3-2. 実験結果

2-3-1. TAC マウスのうつ様行動と脳におけるシグマ 1 受容体発現量の検討

圧負荷心肥大・心不全モデルである TAC マウスがうつ様症状を呈するのか否かについて検討するために、TAC 後 2、4 および 6 週目において強制水泳試験 (Forced Swimming test) および尾懸垂試験 (Tail Suspension test) を行った (Fig. 10A, B)。その結果、両試験ともに TAC6 週後においてのみ無動時間が有意に上昇した。そこで、うつ病との関連が知られている海馬 CA1 領域、歯状回 (dentate gyrus; DG) 領域および内側前頭前野 (medial prefrontal cortex; mPFC) におけるシグマ 1 受容体の発現量を免疫ブロットで検討した (Fig. 10C, D)。その結果、TAC 後 4 週目より海馬 CA1 および DG 領域におけるシグマ 1 受容体の発現が低下した。

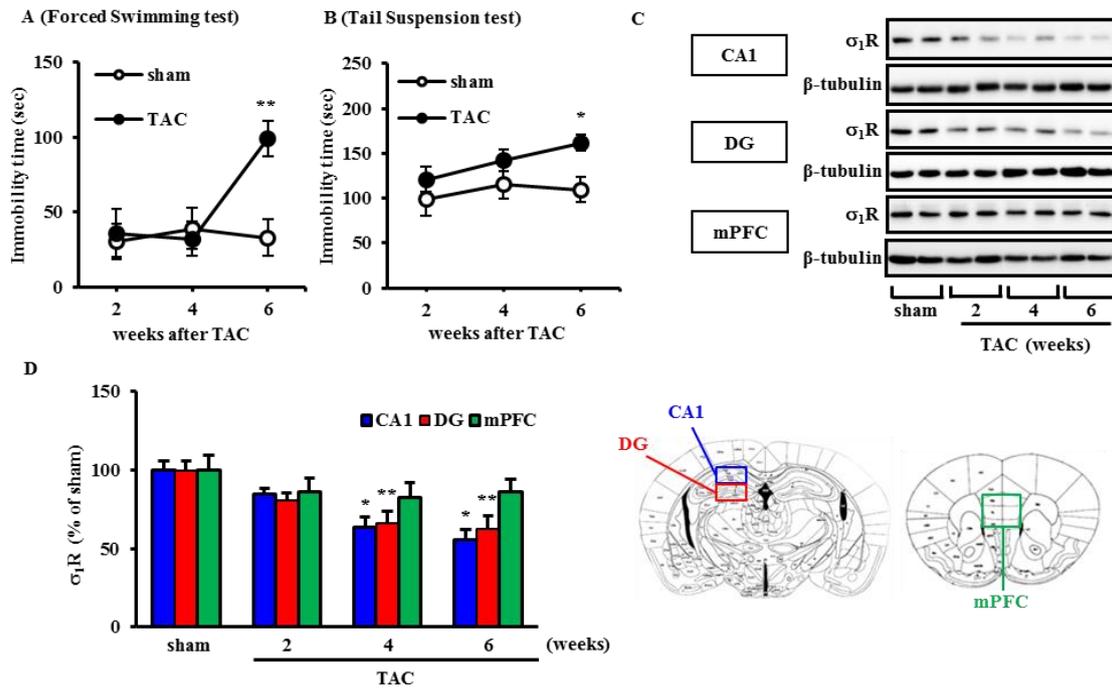


Fig. 10: Time course of depressive-like behaviors and σ_1R expression.

A: Immobility time in a forced swimming test was measured 2, 4 and 6 weeks after TAC surgery. B: Immobility time in a tail suspension test was similarly measured. Groups consisted of 6-8 mice. C: Western blot analysis of σ_1R and β -tubulin (as a loading control) proteins in the CA1 region, dentate gyrus (DG) and medial prefrontal cortex (mPFC) of sham and TAC mice.

Immunoblotting with anti- β -tubulin antibody indicates equal protein loading. D: Densitometric quantification of σ_1R immunoreactivity (n = 6). Columns represent means \pm S.E.M. $F(3, 20) = 4.875, P < 0.05$ (CA1); $F(3, 20) = 6.182, P < 0.01$ (DG); $F(3, 20) = 0.698, P = 0.564$ (mPFC). *, $P < 0.05$ and **, $P < 0.01$ versus sham-operated mice.

2-3-2. TAC マウスのうつ様行動に対するシグマ 1 受容体アゴニスト SA4503 の効果

TAC 後 2 週目より、シグマ 1 受容体アゴニスト SA4503 およびアンタゴニスト NE100 の経口投与を行い、これらの化合物が TAC マウスのうつ様行動に与える効果を検討した (Fig. 11)。結果として、強制水泳試験において見られた TAC マウスの無動時間の上昇は、SA4503 の投与により容量依存的に減少し、0.3 mg/kg および 1.0 mg/kg の容量で統計学的有意差を示した (Fig. 11A; $P < 0.01$ vs. TAC vehicle)。また、NE100 の併用投与により SA4503 1.0 mg/kg の効果はほぼ完全に消失した ($P < 0.01$ vs. TAC SA1.0)。このことから、SA4503 はシグマ 1 受容体を介して、抗うつ作用を示すことが示唆された。尾懸垂試験においても、SA4503 は無動時間を減少する傾向を示した (Fig. 11B)。さらに、1%スクロース溶液を用いてショ糖嗜好性試験を行い、うつ病の主症状の一つの無欲症状を評価した (Fig. 11C)。その結果、TAC マウスは Sham マウスと比較して、ショ糖溶液に対する嗜好性が低下した ($P < 0.01$)。さらに、SA4503 (1.0 mg/kg) の投与は嗜好性の低下を有意に改善し ($P < 0.05$)、NE100 の併用によりこの効果は消失した。これらの結果から、シグマ 1 受容体アゴニスト SA4503 は、シグマ 1 受容体を介して抗うつ作用を示すことが明らかとなった。

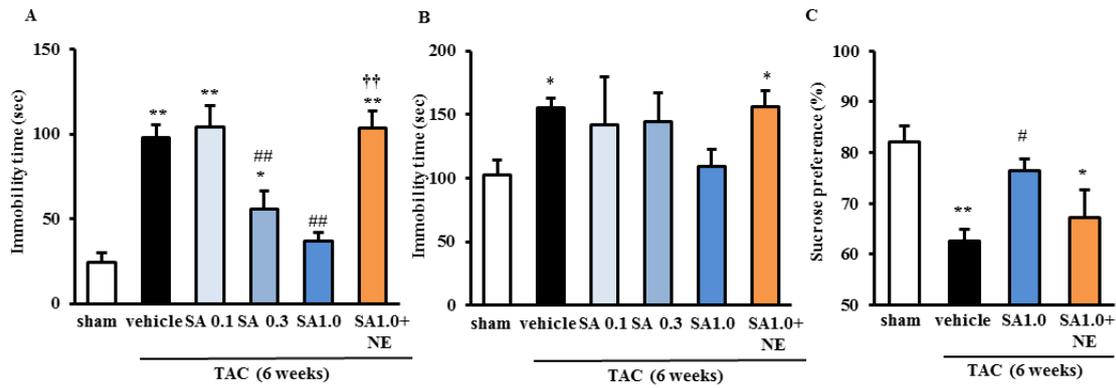


Fig. 11: Effects of SA4503 treatment on depressive-like behaviors in TAC mice.

A: Immobility time in a forced swimming test was measured 6 weeks after TAC surgery with or without drug treatment for the last 4 weeks. B: Immobility time in a tail suspension test was similarly measured. TAC mice were treated with SA4503 (0.1, 0.5 or 1.0 mg/kg) or SA4503 (1.0 mg/kg) plus NE-100 (1.0 mg/kg), as indicated (n = 6). $F(5, 37) = 20.740$, $P < 0.01$ (forced swimming); $F(5, 38) = 2.692$, $P < 0.05$ (tail suspension). C: Consumption of normal water and 1% sucrose solution was measured in continuous 5 days. Sucrose preference (%) was calculated as ratio of 1% sucrose solution consumption to total consumption. TAC mice were treated with SA4503 (1.0 mg/kg) or SA4503 (1.0 mg/kg) plus NE-100 (1.0 mg/kg), as indicated (n = 6). Columns represent means \pm S.E.M. *, $P < 0.05$ and **, $P < 0.01$ versus the sham group; #, $P < 0.05$ and ##, $P < 0.01$ versus the TAC/vehicle treated group; ††, $P < 0.01$ versus the TAC plus SA4503 (1 mg/kg)-treated group.

2-3-3. TAC マウス海馬および左心室におけるシグマ 1 受容体の発現、ATP 含量に対する SA4503 の効果

次に、TAC マウスの海馬 CA1、DG 領域および左心室におけるシグマ 1 受容体の発現低下に対する SA4503 の効果を免疫ブロットで検討した (Fig. 12)。結果として、SA4503 (1.0 mg/kg) の投与は、CA1 および DG 領域におけるシグマ 1 受容体の発現低下を有意に改善した (Fig. 12A, B; $P < 0.05$ および < 0.01)。また興味深いことに、NE100 の併用投与は SA4503 によるシグマ 1 受容体発現上昇に影響を及ぼさなかった。

過去の報告 (Tagashira H et al., 2013b) と同様に、SA4503 (0.3 mg/kg および 1.0 mg/kg) の投与は TAC マウスの左心室におけるシグマ 1 受容体発現の低下を改善した (Fig. 12C, D)。NE100 は、海馬の場合と同様に左心室においても SA4503 の効果に影響を及ぼさなかった。

過去の報告において、SA4503 が TAC マウス左心室における ATP 含量の低下を改善することを報告した (Tagashira H et al., 2013b)。そこで今回、同様の検討を海馬 (CA1+DG) および左心室について行った (Fig. 13)。その結果、TAC マウス海馬においても同様に ATP 含量が低下し ($P < 0.01$ vs. Sham)、SA4503 (1.0 mg/kg) の投与により有意に改善した ($P < 0.05$ vs. TAC vehicle)。これらの結果から、SA4503 によるシグマ 1 受容体発現量の上昇と ATP 含量の低下改善は、抗うつ作用と正に相関することが明らかとなった。

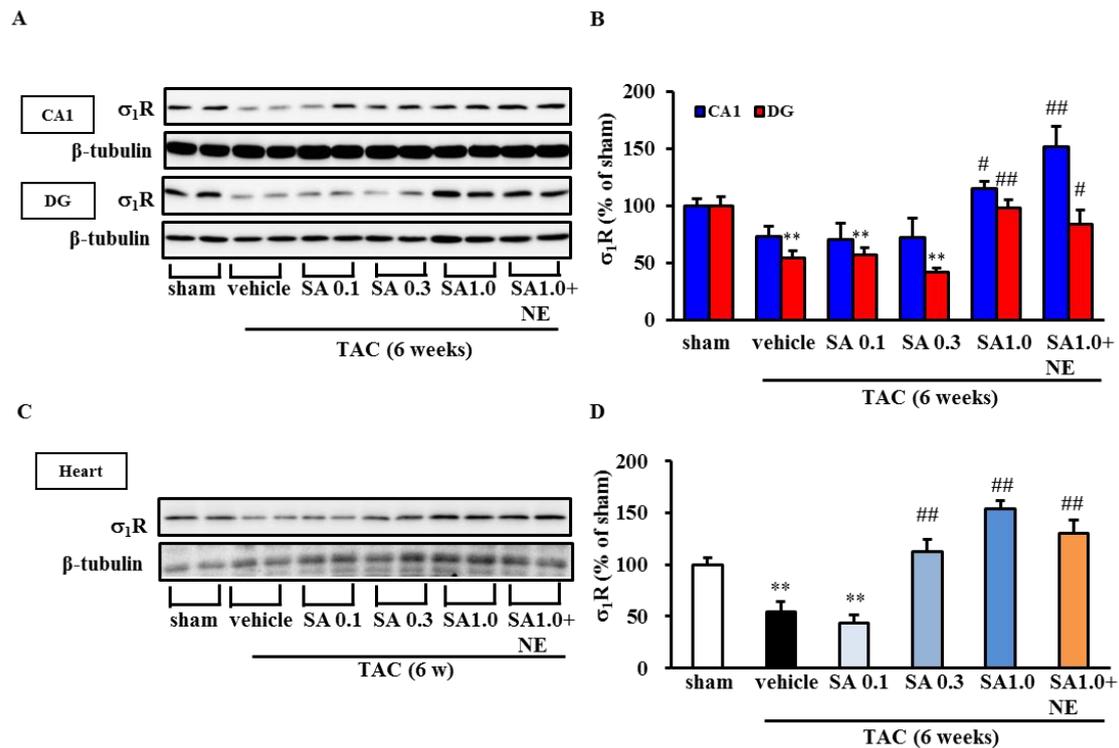


Fig. 12: Effect of SA4503 treatment on hippocampal σ_1R expression.

A: Western blot analysis of σ_1R and β -tubulin (as a loading control) proteins in the CA1 region and dentate gyrus (DG) of sham and TAC-mice. Immunoblotting with anti- β -tubulin antibody indicates equal protein loading.

B: Densitometric quantification of σ_1R immunoreactivity. $F(5, 32) = 7.128$, $P < 0.01$ (CA1); $F(5, 26) = 9.868$, $P < 0.01$ (DG).

C: Western analysis of σ_1R and β -tubulin (as a loading control) proteins in the LV of sham and TAC-mice with or without drug treatment. Immunoblotting with anti- β -tubulin antibody indicates equal protein loading.

D: Densitometric quantification of σ_1R immunoreactivity. $F(5, 47) = 20.484$, $P < 0.01$. Data are expressed as percentages of values of sham-operated animals (mean \pm S.E.M.) **, $P < 0.01$ versus the sham group; #, $P < 0.05$ and ##, $P < 0.01$ versus the TAC/vehicle-treated group.

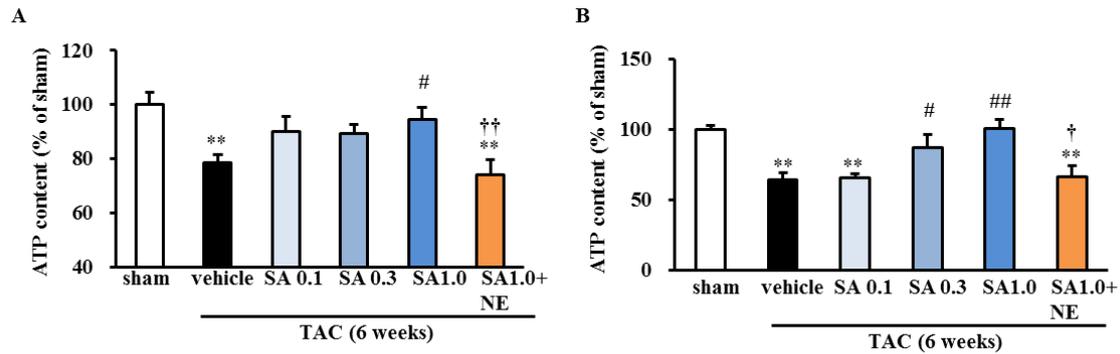


Fig. 13: Effect of SA4503 treatment on hippocampal ATP content.

A: Measurement of cellular ATP content in hippocampal tissue of TAC mice 6 weeks after surgery with or without drug treatment during the last 4 weeks (n = 6). $F(5, 47) = 6.284$, $P < 0.01$. B: Measurement of cellular ATP content in the LV of TAC mice with or without drug treatment (n = 6). $F(5, 54) = 15.089$, $P < 0.01$. Data are expressed as percentages of values of sham-operated animals (mean \pm S.E.M.) **, $P < 0.01$ versus the sham group; #, $P < 0.05$ and ##, $P < 0.01$ versus the TAC/vehicle-treated group; †, $P < 0.05$ and ††, $P < 0.01$ versus the TAC plus SA4503 (1 mg/kg)-treated group.

2-3-4. シグマ 1 受容体発現の免疫染色による検討

次に、海馬におけるシグマ 1 受容体の発現について、免疫染色法を用いて検討した (Fig. 14)。その結果、Sham マウスにおいてシグマ 1 受容体の蛍光シグナルは、海馬 CA1 分子層に位置する GFAP 陽性のアストロサイトに強くみられ、錐体細胞層の神経細胞にはわずかに発現が見られた (Fig. 14A)。また、TAC6 週間後の海馬 CA1 領域においては、シグマ 1 受容体の蛍光シグナルが低下した。なお、DAPI による核の染色像より、錐体神経細胞数をカウントしたところ、Sham 群と TAC 群に差はなかった (Sham; 71.2 ± 4.6 cells / $0.35 \mu\text{m} \times 0.35 \mu\text{m}$, TAC; 70.0 ± 3.1 cells / $0.35 \mu\text{m} \times 0.35 \mu\text{m}$)。GFAP 陽性アストロサイトについても同様に差はなかった (Sham; 16.5 ± 1.7 cells / $0.35 \mu\text{m} \times 0.35 \mu\text{m}$, TAC; 12.3 ± 0.9 cells / $0.35 \mu\text{m} \times 0.35 \mu\text{m}$)。同様に DG 領域においてもシグマ 1 受容体の蛍光シグナルは主に分子層と歯状回門に位置するアストロサイトに強くみられた (Fig. 14B)。また、TAC6 週間後の海馬 DG 領域においても、シグマ 1 受容体の蛍光シグナルが低下した。なお、DG 領域における GFAP 陽性アストロサイトの数は TAC によって変化しなかった (Sham; 23.5 ± 2.0 cells / $0.35 \mu\text{m} \times 0.35 \mu\text{m}$, TAC; 21.0 ± 2.3 cells / $0.35 \mu\text{m} \times 0.35 \mu\text{m}$)。さらに、SA4503 を投与した TAC マウスの海馬 CA1、DG 領域においては、シグマ 1 受容体の発現低下は改善したが (Fig. 14A, B)、NE100 の併用投与はこの SA4503 の効果に影響を与えなかった。これらの結果は、免疫ブロットの結果と一致している。

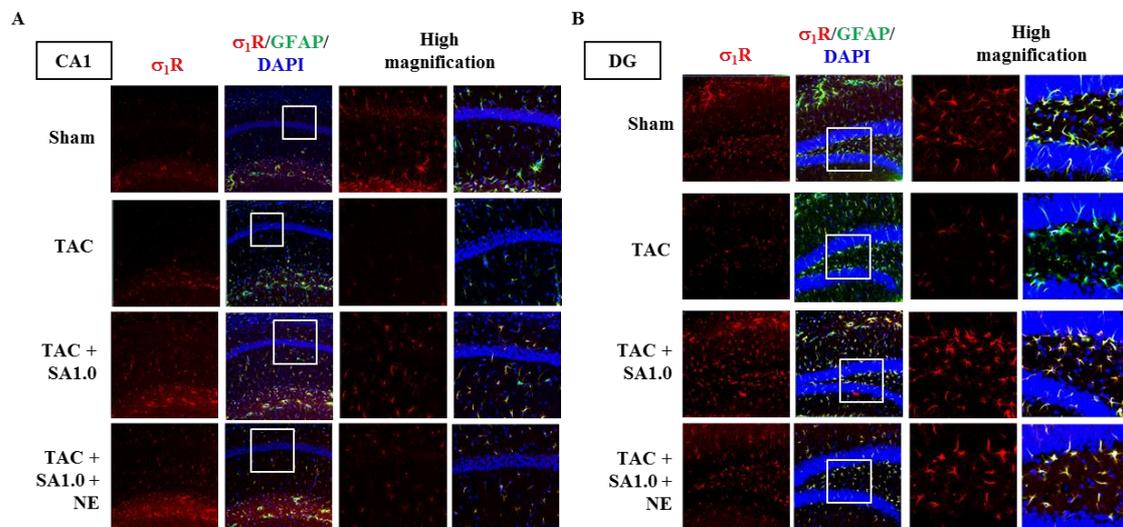


Fig. 14: Effect of SA4503 treatment on σ_1R expression in hippocampal astrocytes.

A: Immunofluorescence showing localization of σ_1R (red) with the astrocyte marker GFAP (green) and DAPI (blue) in the CA1 region 6 weeks after TAC surgery with or without drug treatment for the last 4 weeks. B:

Immunofluorescence showing localization of σ_1R (red) with GFAP (green) and DAPI (blue) in DG 6 weeks after TAC surgery with or without drug treatment for last 4 weeks. TAC mice were treated with SA4503 (0.1, 0.5 or 1.0 mg/kg) or SA4503 (1.0 mg/kg) plus NE-100 (1.0 mg/kg), as indicated. Boxed regions in all panels are magnified in adjacent right-hand panels.

2-3-5. TAC マウスのうつ様行動とコルチコステロンとの関連性の検討

次に我々は、TAC マウス海馬で見られたシグマ 1 受容体の発現低下の原因を探るうえで、これまでうつ病患者において血中濃度が増加することなどが報告されているコルチコステロンに着目した (Gregus A et al., 2005; Nemeroff CB et al., 1984; Tsigos C and Chrousos GP, 2002)。TAC マウスの血漿コルチコステロン濃度を ELISA 法で検討したところ、経時的に増加し TAC4 週目より、統計学的に有意差を示した (Fig. 15A; $P < 0.01$ vs. control)。さらに、海馬組織中のコルチコステロン量も、上昇傾向にあった (control; 1.11 ± 0.11 ng/mg tissue, TAC 6 weeks; 1.35 ± 0.16 ng/mL)。

さらに我々は、無処置のマウスにコルチコステロンの慢性投与 (20 mg/kg/day, s.c.)を行い、さらなる検討を行った (Fig. 15B, C, Fig. 16)。投与開始後、1 週および 3 週目において強制水泳試験および尾懸垂試験を行ったところ、両試験ともに経時的な無動時間の増加が観察された (Fig. 15B, C)。特に、強制水泳試験においてはコルチコステロンを 3 週間投与したマウスに有意な無動時間の増加が生じた ($P < 0.05$)。

コルチコステロン投与が海馬におけるシグマ 1 受容体の発現に与える影響を免疫ブロットおよび免疫染色法により検討した (Fig. 16)。その結果、1 週間および 3 週間のコルチコステロン投与を行ったマウスの海馬 CA1、DG 領域において、シグマ 1 受容体の発現量が低下した (Fig. 16A, B)。免疫染色によっても同様の結果が得られた (Fig. 16C, D)。一方、コルチコステロン投与は左心室におけるシグマ 1 受容体の発現には影響しなかった (control; $100 \pm 6.6\%$, CORT 1 week; $88.1 \pm 7.1\%$, CORT 3 weeks; $107.9 \pm 9.3\%$)。以上の結果より、TAC マウスにおける血漿コルチコステロンの増加は、海馬におけるシグマ 1 受容体の発現低下のみに関与し、左心室における発現低下には関与しないことが示唆さ

れた。

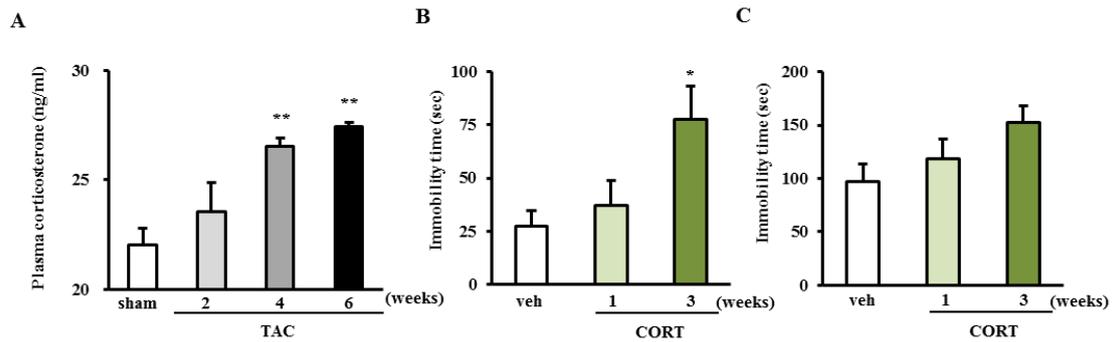


Fig. 15: Effects of TAC surgery on plasma CORT levels, and CORT treatment on immobility time in mice.

A: Measurement of plasma CORT levels in TAC mice. $F(3, 21) = 16.602$, $P < 0.01$. B: Immobility time in a forced swimming test was measured after 1 and 3 weeks of chronic CORT treatment. $F(2, 24) = 4.193$, $P < 0.05$. C: Immobility time in a tail suspension test was similarly measured. Groups consisted of 8-11 mice. $F(2, 24) = 2.224$, $P = 0.130$. *, $P < 0.05$ and **, $P < 0.01$ versus sham-operated mice or vehicle-treated mice.

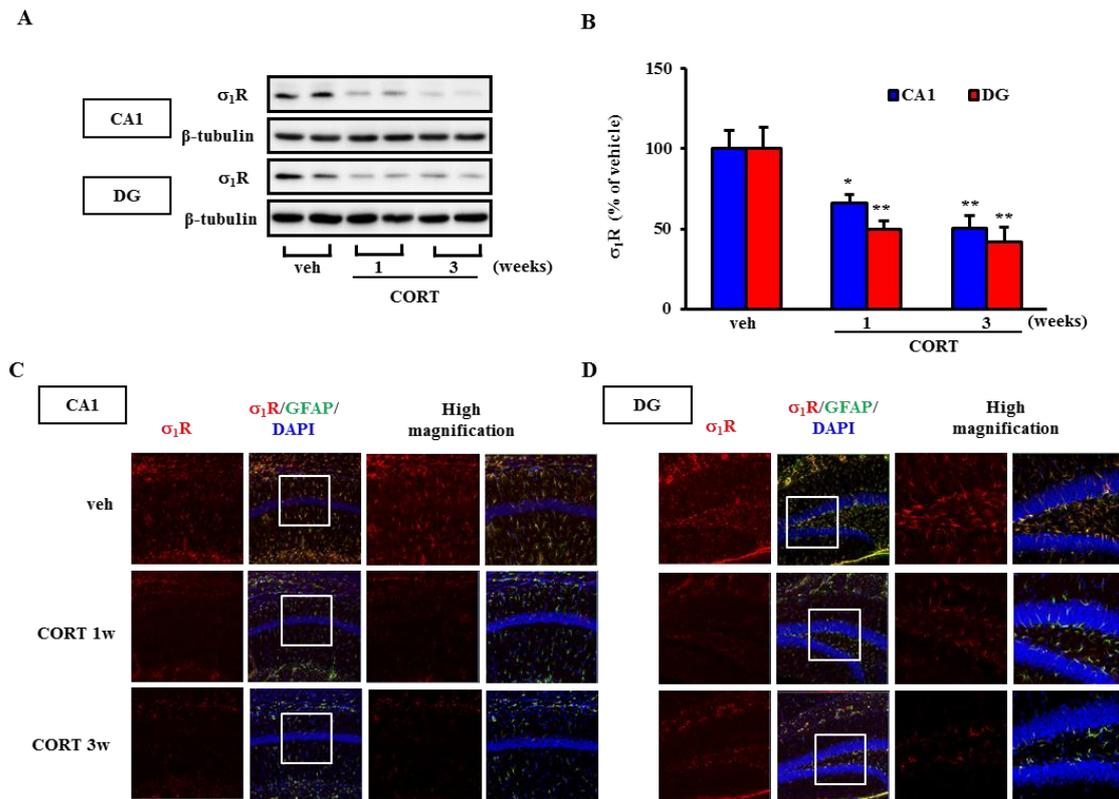


Fig. 16: Effect of CORT treatment on hippocampal σ_1R protein levels.

A: Western blot analysis of σ_1R and β -tubulin (as a loading control) proteins in the CA1 region and dentate gyrus (DG) of vehicle and CORT treated-mice. Immunoblotting with anti- β -tubulin antibody indicates equal protein loading. B: Densitometric quantification of σ_1R immunoreactivity (n = 6). Columns represent means \pm S.E.M. $F(2, 15) = 8.877$, $P < 0.01$ (CA1); $F(2, 15) = 10.614$, $P < 0.01$ (DG). In A, B and E, *, $P < 0.05$ and **, $P < 0.01$ versus vehicle-treated mice. C: Immunofluorescence staining showing localization of σ_1R (red) with the astrocyte marker GFAP (green) and DAPI (blue) in CA1. D: Similar analysis in the DG. Boxed regions in C and D are magnified in adjacent right-hand panels.

2-3-6. TAC マウスのうつ様行動および海馬シグマ 1 受容体の発現低下に対する グルココルチコイド受容体拮抗薬ミフェプリストンの効果の検討

次に我々は、コルチコステロンの受容体であるグルココルチコイド受容体の薬理的阻害が、TAC マウスのうつ様行動や海馬におけるシグマ 1 受容体の発現低下に与える影響を検討した。SA4503 の場合と同様に、TAC マウスに術後 2 週目より 6 週目までグルココルチコイド受容体拮抗薬ミフェプリストン (50 mg/kg/day, s.c.) の投与を行った。結果として、強制水泳試験ではミフェプリストンは TAC マウスの無動時間をわずかに減少させるのみだったが、尾懸垂試験では Sham マウスとほぼ同レベルまで減少させた (Fig. 17A, B; $P < 0.05$ vs. TAC vehicle)。さらに、ミフェプリストンは TAC マウス海馬 CA1、DG 領域において低下したシグマ 1 受容体の発現量を有意に改善した (Fig. 17C, D)。これらの結果から、TAC マウスのうつ様行動および海馬シグマ 1 受容体の発現低下には、血中コルチコステロン濃度の上昇が部分的ではあるが、関与していることが明らかとなった。

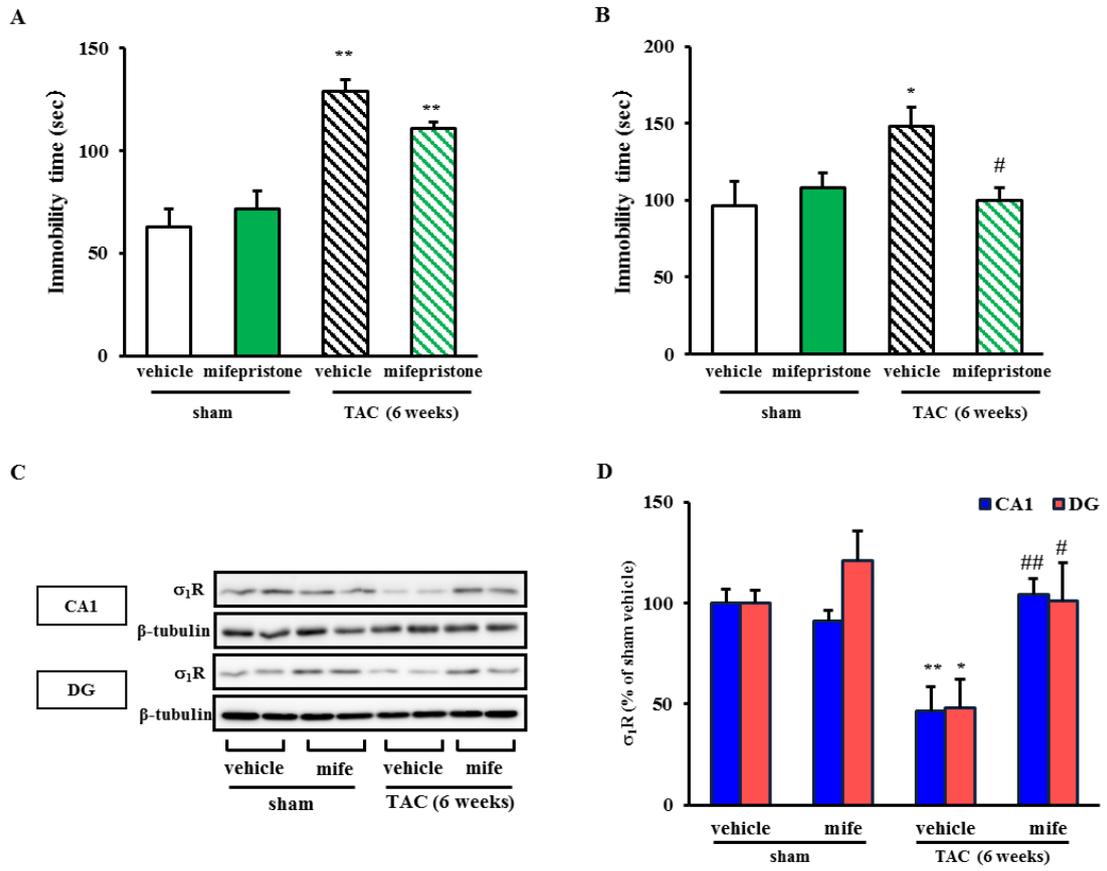


Fig. 17: Effect of mifepristone on depressive-like behaviors and hippocampal σ_1 R expression in TAC mice.

A: Immobility time in a forced swimming test was measured 6 weeks after TAC surgery with or without drug treatment for the last 4 weeks. $F(3, 17) = 13.973$, $P < 0.01$. B: Immobility time in a tail suspension test was similarly measured. Sham and TAC mice were treated with vehicle or mifepristone (mife) (50 mg/kg) as indicated ($n = 4-7$). $F(3, 14) = 3.490$, $P < 0.05$. Columns represent means \pm S.E.M. *, $P < 0.05$ and **, $P < 0.01$ versus the sham/vehicle group; #, $P < 0.05$ versus TAC/vehicle treated group. C: Western blot analysis of σ_1 R and β -tubulin (as a loading control) proteins in the CA1 region and dentate gyrus (DG) of sham and TAC mice treated with vehicle or mifepristone. Immunoblotting with anti- β -tubulin antibody indicates equal protein loading. D: Densitometric quantification of σ_1 R immunoreactivity ($n = 4$). Columns represent means \pm S.E.M. $F(3, 16) = 9.009$, $P < 0.01$ (CA1); $F(3, 20) = 4.885$, $P < 0.05$. *, $P < 0.05$ and **, $P < 0.01$ versus sham/vehicle-treated mice. #, $P < 0.05$ and ##, $P < 0.01$ versus the TAC/vehicle-treated mice.

2-3-7. TAC マウスの心肥大・心不全病態に対するシグマ 1 受容体アゴニスト SA4503 の効果

当研究室ではこれまで、TAC 後翌日などの早い段階から薬剤の投与を開始し、効果を検討してきた (Tagashira H et al., 2010; Tagashira H et al., 2013b)。一方、今回は TAC 後 2 週目から 6 週目までシグマ 1 受容体アゴニスト SA4503 の投与を行った。今回のタイムコースでもこれまで報告してきたような心保護作用を有するか否かを検討した (Fig. 18)。心エコーでの撮影像より、左室短縮率 (FS)、左室収縮末期径 (LVESD) および左室拡張末期径 (LVEDD) をそれぞれ算出し、比較した (Fig. 18A-D)。その結果、TAC マウスにおいて見られた FS の減少および LVESD の上昇は、SA4503 の投与により容量依存的に改善した (Fig. 18B, C)。また、この作用は NE100 を併用投与することにより、ほぼ完全に消失した。一方で、TAC マウスにおいて上昇した LVEDD については、SA4503 は改善傾向を示したものの、有意差は認められなかった (Fig. 18D)。さらに、心臓を摘出し重量を測定して、体重に対する心重量を比較した (Fig. 18E)。その結果、TAC マウスで増加した HW/BW は、SA4503 の投与によりほぼ完全に改善した。またこの作用は、NE100 の併用投与によりほぼ完全に消失した。これらの結果から、術後直後から SA4503 の投与を開始した場合と同様に、2 週間後から投与した場合でも、シグマ 1 受容体を介する心保護作用を示すことが明らかとなった。

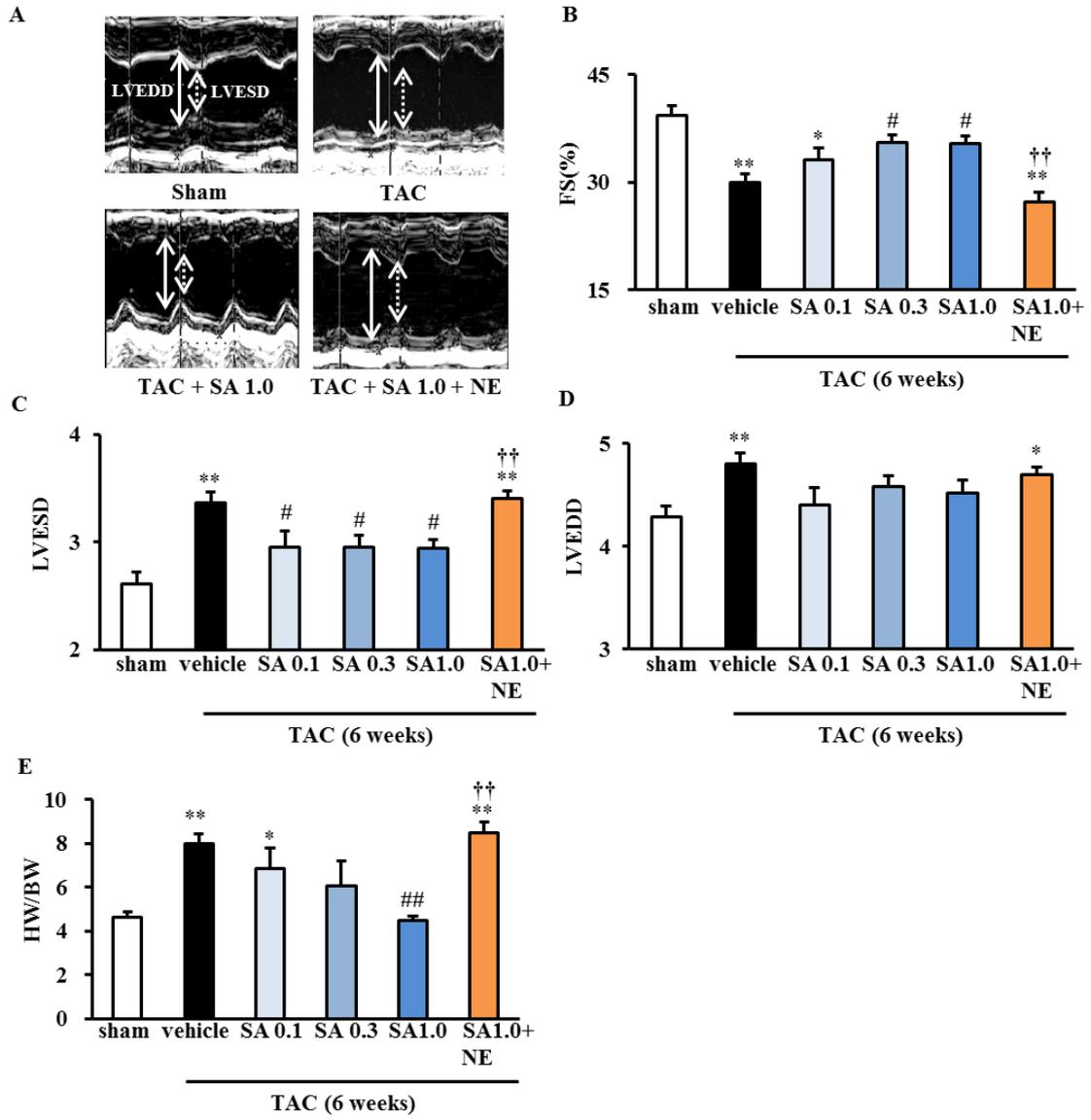


Fig. 18: Effect of SA4503 and NE-100 on cardiac failure and hypertrophy induced by TAC.

A: Representative M-mode echocardiograms of mice treated with or without SA4503 plus or minus NE-100. B: Changes in the percentage of LV fractional shortening (FS%). C: Changes of left ventricular end-systolic diameter (LVESD). D: Changes of left ventricular end-diastolic diameter (LVEDD). TAC mice were treated with SA4503 (0.1, 0.3 or 1.0 mg/kg) or SA4503 (1.0 mg/kg) plus NE-100 (1.0 mg/kg) as indicated. E: TAC-induced cardiac hypertrophy as indicated by the heart weight/body weight (HW/BW) ratio. Groups consisted of 6-8 mice. Bars represent means \pm S.E.M. $F(5, 45) = 12.559, P < 0.01$ (FS); $F(5, 45) = 10.317, P < 0.01$ (LVESD); $F(5, 45) = 3.053, P < 0.05$ (LVEDD); $F(5, 18) = 8.383, P < 0.01$ (HW/BW). *, $P < 0.05$ and **, $P < 0.01$ versus sham group; #, $P < 0.05$ and ##, $P < 0.01$ versus the TAC/vehicle-treated group; ††, $P < 0.01$ versus the TAC plus SA4503 (1 mg/kg)-treated group.

2-3-8. SA4503 の投与が交感神経系に与える効果の検討

Ito らは以前、シグマ 1 受容体アゴニスト PRE084 が交感神経系の抑制を介して、圧負荷心不全モデルなどの病態を改善すること報告した (Ito K et al., 2012)。そこで、SA4503 が交感神経系に与える効果を評価することを目的に、TAC 後 2 週、4 週および 6 週の時点でテイルカフによる末梢循環動態を解析した (Fig. 19)。心拍数 (heart rate; HR) は 3 つの時点で Sham 群と TAC 群に差はなく、SA4503 もまた影響を及ぼさなかった (Fig. 19A, B)。平均血圧 (mean blood pressure; MBP)、弛緩期血圧 (diastolic blood pressure; DBP) および収縮期血圧 (systolic blood pressure; SBP) について Sham 群と TAC 群を比較した場合、いくつかの時点で差が生じた (Fig. 19C, E, and G)。しかし、SA4503 の慢性投与は、これらの値に影響を及ぼさなかった (Fig. 19D, F, and H)。これらの結果から、報告とは異なり、SA4503 は交感神経の活性に影響を及ぼさないことが明らかとなった。

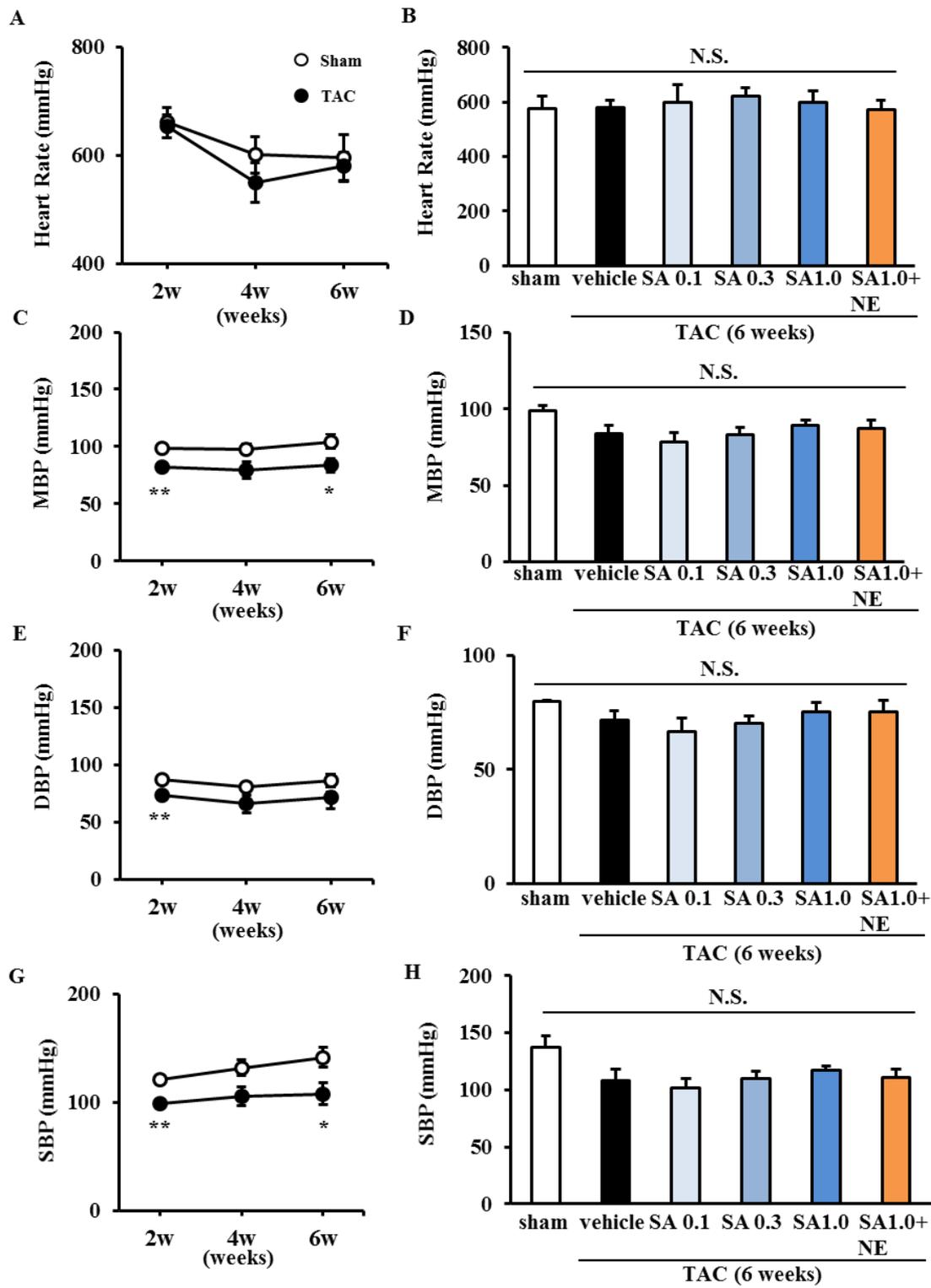


Fig. 19: Effect of SA4503 treatment on sympathetic nervous activity as indicated by peripheral blood pressure.

Measurement of peripheral blood pressure using the tail-cuff method. A, B: Heart rate (HR) was measured 2, 4 and 6 weeks after TAC surgery (A), and at 6 weeks with or without drug treatment for the last 4 weeks (B). C, D: Mean Blood Pressure (MBP) was measured at the same time points (C) with or without drug treatment for the last 4 weeks (D). E, F: Diastolic Blood Pressure (DBP) was similarly measured (E) with or without drug treatment for the last 4 weeks (F). G, H: Systolic Blood Pressure (SBP) was similarly measured (G) with or without drug treatment for the last 4 weeks (H). TAC mice were treated with SA4503 (0.1, 0.5 or 1.0 mg/kg) or SA4503 (1.0 mg/kg) plus NE-100 (1.0 mg/kg), as indicated. Groups consisted of 6 mice. Columns represent means \pm S.E.M. $F(5, 28) = 0.216, P = 0.953$ (HR); $F(5, 28) = 1.821$ (MBP); $F(5, 28) = 1.144, P = 0.361$ (DBP); $F(5, 28) = 2.288, P = 0.730$ (SBP). *, $P < 0.05$ and **, $P < 0.01$ versus the sham group.

3-3. 考察

本研究では次の四点を明らかとした。①TAC マウスは、術後 6 週目においてうつ様行動を呈する。②この病態には、海馬アストロサイトにおけるシグマ 1 受容体の発現低下が関与する。③シグマ 1 受容体選択的アゴニスト SA4503 の投与により、心不全病態のみならず、うつ様行動も改善する。④血中コルチコステロンレベルの増加が、TAC マウスにみられるシグマ 1 受容体の発現低下やうつ様行動の一因である。これらの結果を総合すると、Fig. 20 にあるように、視床下部—下垂体—副腎皮質 (hypothalamic-pituitary-adrenal; HPA) 系を介した心不全病態とうつ様症状のクロストークが考えられる。本検討から、心不全に由来する炎症反応やストレスにより HPA 系を介したコルチコステロンの遊離が生じ、脳、とりわけ海馬におけるシグマ 1 受容体の発現低下を引き起こすことが明らかとなった (Fig. 20)。シグマ 1 受容体の低下は、ミトコンドリア ATP 産生の低下を引き起こし、さらには脳機能に障害を与え、うつ様症状が生じる。うつ様行動は、交感神経系の異常を介してさらに心機能を低下させる可能性も示唆される。

当研究室では以前、神経細胞におけるシグマ 1 受容体の発現低下が、IP₃R を介するミトコンドリアへの Ca²⁺輸送や ATP 産生の異常を引き起こすことを報告した (Shioda N et al., 2012)。ATP はそのものがエネルギーとして利用されるのみならず、中枢における神経細胞やグリア細胞の細胞外シグナリング分子としても働く (Fields RD and Burnstock G, 2006)。例として、海馬のスライス切片にノルエピネフリン刺激を行うことにより、アストロサイトでの ATP 産生を促進し、シナプス伝達効率を促進することが報告されている (Gordon GR et al., 2005)。我々は今回、SA4503 投与が TAC マウス海馬にみられるシグマ 1 受容

体発現の低下を改善し、ATP 産生を亢進することを明らかとした。Cao らは、アストロサイトに発現する IP₃R type2 の遺伝子改変マウスの解析を行い、このマウスが、前頭前野や海馬における ATP 産生の低下を示すとともうつ様症状を呈することを報告した (Cao X et al., 2013)。この報告で彼らは、急性の ATP 刺激が P2X₂ 受容体の活性化を介して、うつ様行動を改善することを合わせて報告している。そして、海馬や皮質アストロサイトにおける ATP 産生の低下が、うつ様行動の誘導に非常に重要であると結論付けた。本研究の結果とあわせ、海馬におけるシグマ 1 受容体の発現低下に伴う ATP 産生の低下が、TAC マウスのうつ様行動に関与していることが示唆される。

TAC マウスにおいて、シグマ 1 受容体の発現低下が生じたのは、海馬アストロサイトに限局していた。一方 Ito らは脳抽出物を用いて、シグマ 1 受容体アゴニスト PRE084 が圧負荷・高塩濃度食モデルマウスにみられるシグマ 1 受容体の発現低下を改善することを報告した (Ito K et al., 2012)。また当研究室ではこれまで、フルボキサミン、ペンタゾシンおよび SA4503 などのシグマ 1 受容体アゴニストが心不全状態の左心室におけるシグマ 1 受容体の発現低下を改善することを報告してきた (Tagashira H et al., 2011, 2013b, and 2013c)。これらの報告の中で、シグマ 1 受容体アンタゴニスト NE100 の併用投与がアゴニストによる病態改善を阻害する一方、シグマ 1 受容体の発現改善に対しては阻害しないことが明らかとなった。これらは、今回見られた TAC マウスのシグマ 1 受容体発現量の挙動と一致している。総合すると、SA4503 による TAC マウスのうつ様行動や心不全病態の改善は、シグマ 1 受容体発現量の上昇ではなく、その活性化が関与していることが示唆される。しかし、どのようなメカニズムで SA4503 が低下したシグマ 1 受容体の発現を改善するかは現在の所、明らかではない。

TAC マウスでは、術後 4 週および 6 週の時点で血中コルチコステロン濃度が有意に増加した。さらには、コルチコステロンの慢性投与はマウス海馬におけるシグマ 1 受容体発現量を減少させた。さらには、ミフェプリストン投与によりグルココルチコイド受容体を阻害することで、TAC マウス海馬において低下したシグマ 1 受容体の発現量は有意に改善した。グルココルチコイド受容体はラット海馬において豊富に発現していることが報告されている (Reul JM, and de Kloet ER. 1985)。また、心不全患者を対象にしたコホート研究では、致死率と血中コルチコステロン濃度に高い相関があることが報告されている (Yamaji M et al., 2009)。これらの知見から、血中コルチコステロン濃度の上昇は、海馬シグマ 1 受容体発現量の低下および TAC 誘導性うつ様症状、両者のリスクファクターであることが推察される。今後は、TAC によりコルチコステロンが誘導されるメカニズムや、その結果としてシグマ 1 受容体発現量が低下するメカニズムを明らかにしなければならない。

本研究ではさらに、TAC 誘導性のうつ様行動におけるグルココルチコイド受容体の関与を示した。興味深いことに、うつ病患者では副腎グルココルチコイドなどのストレスホルモンの分泌が亢進していることや、SSRI がこの分泌を正常化することが報告されている (Hasler G et al., 2004)。また別の報告では、循環器疾患患者やうつ病患者において、血中のコルチゾールやコルチコステロンレベルが上昇していること (Nemeroff CB et al., 1984; Guder G et al., 2007)、さらには、グルココルチコイドの濃度上昇が循環器疾患のリスクを高めることが報告されている (Wei L et al., 2004)。臨床研究では、HPA 系の亢進したうつ病患者において、交感神経系の機能亢進や副交感神経系の機能低下といった自律神経系の制御異常が生じ、結果的に血圧の上昇や心拍変動の低下、不整脈の惹起などを引き起こし、心血管イベントのリスクを高めると考えられている

(Bradley SM and Rumsfeld JS, 2015)。同様に、循環器疾患患者やうつ病患者において血中の炎症性サイトカインレベルが上昇している (Dowlati Y et al., 2010; Katz SD et al., 1994)。HPA 系は炎症性サイトカインの上昇などによるストレスで活性化されること、血中で増加したコルチコステロンは炎症反応にかかわる遺伝子群の発現を上昇することが報告されている (Eisenberger NI and Cole SW, 2012; Haddad JJ et al., 2002; Zunszain PA et al., 2011)。このように、抑うつに伴うコルチコステロンと炎症性サイトカインの上昇は循環器疾患のリスクを高めることが予想される (Fig. 20)。

また Dantzer らは、マウス末梢へリポポリサッカライド投与を行うことで、サイトカインとうつ様行動が誘導されることを報告している (Dantzer R et al., 2008)。これらに関連して本研究では、TAC 後 6 週目のマウスにおいて、血中コルチコステロンレベルが顕著に上昇したのに応じて、海馬組織中のコルチコステロンレベルも上昇することを明らかにした。この知見は脳内でも免疫応答が誘導されていることを示唆している。

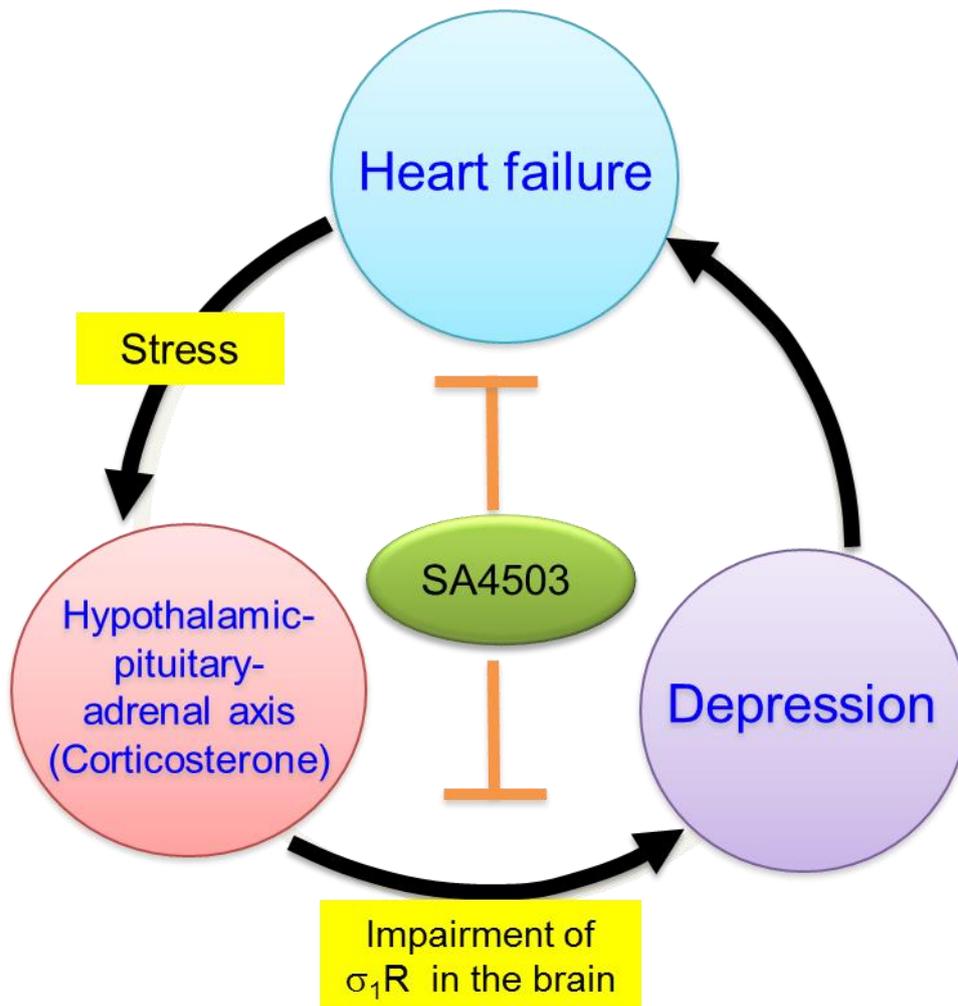


Fig. 20: Schematic representation of the hypothesis tested and results obtained.

Shown is a model depicting mechanisms underlying TAC-induced depressive-like behavior, as suggested by findings presented here.

TAC-induced cardiac σ_1R downregulation induces cardiac dysfunction. At the same time, levels of peripheral pro-inflammatory cytokines and corticosterone increase, aggravating cardiac dysfunction and downregulating brain hippocampal σ_1R levels. σ_1R stimulation with SA4503 blocks TAC-induced σ_1R downregulation in heart and in hippocampus.

3-4. 小括

TAC マウスにおいて、心機能の低下に伴う血中コルチコステロンレベルの上昇により、海馬シグマ 1 受容体が低下することを明らかとした。また本研究からも、TAC モデルは循環器疾患とうつ病の関連メカニズムを検討するうえで、有用であると確認された。さらに、シグマ 1 受容体選択的アゴニストである SA4503 がシグマ 1 受容体の発現を上昇させることで、TAC 誘導性のうつ様行動を改善できることを示した。SA4503 は近年、脳卒中やうつ病に対する第二相臨床試験が行われている (NCT00551109, NCT00639249)。このことは、SA4503 が循環器疾患やうつ病に対する有望な候補治療薬であることを示している。

第四章 総括

まず第二章では、*in vivo* および *in vitro* の系を用いて、ハロペリドールが心肥大に与える作用のメカニズムを検討した。そして、IP₃R を介するミトコンドリアへの Ca²⁺輸送の異常を一因とする ATP 産生の障害が一つのメカニズムであることを明らかとした。CHO 細胞を用いた過去の報告では、シグマ 1 受容体は IP₃R と機能的複合体を形成し、ミトコンドリアへの Ca²⁺輸送を調節することで、ストレス条件下の細胞生存に関与することが報告されている (Hayashi T and Su TP, 2007)。我々も心筋細胞を用いて、シグマ 1 受容体と IP₃R が結合すること、シグマ 1 受容体の活性化がミトコンドリアへの Ca²⁺輸送を介して ATP 産生を促進することを報告している (Tagashira H et al., 2013a, 2013b)。ハロペリドールがミトコンドリアへの Ca²⁺輸送を阻害し、ATP 産生を抑制することを考慮すると、シグマ 1 受容体は心保護的に働くと考えられる。

第三章に関して、これまで様々な臨床的知見からうつ病が循環器疾患のリスクファクターであることが示されてきた。また、SSRI が心筋梗塞に伴う心不全の罹患率や致死率を改善することが報告されている (Taylor CB, 2006)。Hashimoto は、シグマ 1 受容体の機能がうつ病と循環器疾患を関連付ける要因の一つであることを報告している (Hashimoto K, 2013)。以前、Ito らによりシグマ 1 受容体アゴニスト PRE084 が交感神経の抑制を介して、圧負荷・高塩濃度食モデルの心機能低下を改善することを報告している (Ito K et al., 2012)。しかし本研究において、SA4503 は交感神経系に影響を与えなかった。一方当研究室はこれまで、SA4503 が心筋細胞のシグマ 1 受容体を直接活性化することで、ATP 産生の低下や心機能低下を改善することを報告している (Tagashira H et

al., 2013b)。

以上、本研究では圧負荷心不全モデル TAC マウスの心機能低下およびうつ様症状という二つの病態に、左心室および海馬アストロサイトのシグマ 1 受容体発現低下による ATP 産生異常が関与すること、またピルビン酸やシグマ 1 受容体アゴニストを用いた ATP 産生の賦活化によりこれらの病態が改善できることを明らかとした。

第五章 方法

5.1. 実験動物

10 週齢の雄性 ICR マウスおよび妊娠 Wistar ラットは日本エスエルシー（浜松）より購入した。23±1 °C の一定温度、明暗 24 時間サイクル下の部屋において飼育し、えさ・水は自由に摂取させた。1 週間の馴化期間ののち、実験に用いた。なお、本論文中に記載した動物および生体試料を取り扱った実験はすべて、東北大学動物実験専門委員会の承認を得て、動物実験指針に基づいて実施した。

5.2. 圧負荷心肥大モデル (TAC) マウスの作製

TAC マウスの作製は、Rockman らの報告に従い作製した (Rockman HA et al. 1991)。マウスをケタミン (第一三共、東京) 100 mg/kg, i.p. およびキシラジン (Sigma, St. Louis, MO, USA) 5 mg/kg, i.p. により麻酔し、37 °C の保温台上に仰臥位に固定した。気管に挿管したチューブをレスピレーター (シナノ製作所、東京) につなぎ、呼吸管理を行った。大動脈弓を、頭部方向へ進み右総頸動脈と右鎖骨下動脈へと分岐する腕頭動脈と左総頸動脈、これらの起始部の間で狭窄を行った。27 G ニードルの太さまで、7-0 ネスコスーチャー (アルフレッサファーマ、大阪) を用いて狭窄した。術後、2 日あるいは 2 週間の時点で、マウスを無作為に分け、薬物の投与を開始した。

5.3. マウスへの薬物および化合物の投与

今回使用した薬物、化合物は以下のとおりである。Haloperidol (セレネース; 大日本住友製薬、大阪)、sodium pyruvate (和光純薬、大阪)、corticosterone (Sigma)、mifepristone (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA)。SA4503 お

よび NE-100 (N,Ndipropyl-2-[4-methoxy-3-(2-phenylethoxy) phenyl]-ethylaminemonohydrochloride) はそれぞれ浙江大学 (浙江省、中国)、大正製薬 (東京) にご供与いただいた。Haloperidol および corticosterone は 0.5% carboxymethyl cellulose (CMC) 水溶液に、sodium pyruvate、SA4503 および NE100 は 0.9% NaCl 水溶液 (生理食塩水) に、mifepristone は PEG 400 (ナカライテスク、京都) にそれぞれ溶解もしくは懸濁した。各薬物、化合物の投与量および投与方法は以下のとおりである。Haloperidol (0.1 mg/kg)、sodium pyruvate (1.0 mg/kg)、SA4503 (0.1, 0.3, 1.0 mg/kg) および NE-100 (1.0 mg/kg) は、経口投与を行った。Corticosterone (20 mg/kg) および mifepristone (50 mg/kg) は、皮下投与を行った。なお、液量は体重 (kg) あたり 0.1 mL となるようにあらかじめ調製した。また対照群には、等量の溶媒 (生理食塩水、0.5% CMC 水溶液または PEG 400) を投与した。

5.4. 強制水泳試験

うつ様症状の評価を目的に、Porsolt らの報告を参考に行った (Porsolt RD et al., 1977)。縦 25 cm、直径 16 cm のガラスビーカーに約 25°Cの水をはり、マウスを泳がせた。5 分間観察し、無動時間を測定した。泳いだり、体勢保持のために手足を動かしたりせず、動かずに浮いている状態を無動状態とし、無動状態にいた時間を積算し、無動時間とした。

5.5. 尾懸垂試験

うつ様症状の評価を目的に、Steru らの報告を参考に行った (Steru L et al., 1985)。尾を持ち、床から約 50 cm の高さにマウスをつるした。この状態で 5 分間観察し、無動時間を測定した。

5.6. ショ糖嗜好性試験

うつ病の症状の一つである無欲症状を評価することを目的に、ショ糖嗜好性試験を行った。通常の飲用水と 1% sucrose 水溶液を用意し、1 ケージ当たり同様のボトル 2 本にそれぞれ加えた。マウスが自由に摂取できるように 2 本のボトルをケージに設置し、5 日間飼育した。一日ごとの各ボトルの重量を測定し、それらの値から、飲用量を算出した。各ケージごとの総飲用量あたりの 1% sucrose 水溶液飲用量 (%) を算出し、ショ糖嗜好性の指標とした。なお、2 本のボトルの位置は一日ごとに交換し、位置の違いが与える影響を排除した。

5.7. 心エコーによる心機能測定、非観血式末梢血圧測定およびマウス組織の摘出・重量測定、

超音波診断装置 (SSD-6500; 日立アロカメディカル、東京) と 10-MHz リニアトランスデューサ (UST-5545; 日立アロカメディカル) を用いて、ケタミン 100 mg/kg, i.p.、キシラジン 5 mg/kg, i.p. 麻酔下におけるマウスの非観血式心エコーを行った。傍胸骨短軸断層像を撮像し、画像から左室拡張末期径 (left ventricle end-diastolic diameter; LVEDD) および左室収縮末期径 (left ventricle end-systolic diameter; LVESD) を算出した。また、次の等式①より、左室短縮率 (fractional shortening; FS) を算出した。

$$FS = (LVEDD - LVESD) / LVEDD \text{ -----①}$$

撮像情報より、一度の拍出で左室内の血液のどれくらいの割合が送り出されたかを表す ejection fraction (EF) を算出し、FS と合わせ心機能の指標とした。末梢の血圧測定は、テイルカフ (ソフトロン、東京) を用いて、メーカーのマニュアル通りに行った。

心臓、肺の摘出および重量測定は、過去の報告と同様に行った (Tagashira H et al., 2010)。

5.8. ラット新生仔からの初代培養心筋細胞の単離およびトランスフェクション

初代培養心筋細胞の単離は、過去の報告と同様に行った (Tagashira H et al., 2010)。まず、生後 1~3 日の Wistar ラット新生仔を断頭したのち、心臓を氷冷した phosphate buffered saline (PBS; 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH_2PO_4 , 8 mM Na_2HPO_4 , pH 7.4) に回収した。心房を除いた後、心室をハサミで細かく裁断した。PBS で組織片を洗浄したのち、あらかじめ 37°C に温めておいたトリプシン (Try) バッファー [0.1% trypsin (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 0.05% DNase I (Sigma) / PBS] を加え、37°C の湯浴で 10 分間振盪した (100 rpm)。上清を除いたのち、同様に Try バッファーを加え、湯浴で 20 分間振盪した。上清を氷冷した T-inh. バッファー [0.02% trypsin inhibitor (和光純薬), 10% fetal bovine serum (FBS; Thermo Fisher Scientific) / dulbecco's modified eagle's medium (DMEM; 日水製薬)] に回収した。再度同様に、Try バッファーを加え振盪し、T-inh. バッファーへ上清を回収した。さらに Try バッファーを加え、ピペットマン (P1000) で 30 回ピペッティングしたのち、湯浴で 30 分間振盪した。全量を T-inh. バッファーへ移し混合したのち、ワットマンろ紙 (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) でろ過した。1,000 rpm で 10 分間遠心し、上清を除いたのち、細胞のペレットを 10% FBS / DMEM に再懸濁した。線維芽細胞を除く目的で、10 cm のプラスチックディッシュに細胞懸濁液を移し、37°C、5% CO_2 条件下で 80 分間インキュベーションしたのち、上清を回収した。計数したのち、35 mm ディッシュおよび 12 well プレートに播種し、2 日培養後、実験に用いた。薬物刺激として、培地を血清不含の

DMEM に交換したのち、Ang II (final 100 nM)、haloperidol (final 10 nM) および SA4503 (final 1 μ M) を培地に加え、1 時間あるいは 48 時間培養した。

細胞へのトランスフェクションは Lipofectamine 2000 (LF2000; Thermo Fisher Scientific) を用いて行った。ミトコンドリア移行配列を融合した Ca プローブ、ratiometric pericam-mt / pcDNA3 は、宮脇氏 (理研) よりご提供いただいた (Nagai T et al., 2001)。LF2000 0.5 μ L とベクター 0.5 μ g を Opti-MEM 100 μ L 中で混合し、室温で 20 分間インキュベーションしたのち、あらかじめ Opti-MEM 400 μ L を加えておいた各 12 ウェルの細胞に加えた。6 時間の培養ののち、通常のもediumを FBS 含有 DMEM に交換した。薬物刺激などを行い、2 日後にカルシウムイメージングを行った。

5.9. マウスの灌流固定および免疫化学染色

固定および免疫化学染色は、これまでの報告と同様に行った (Shioda et al., 2010, Shioda et al., 2012)。ペントバルビタールの腹腔内投与によりマウスに麻酔をかけたのち、仰臥位に固定した。開胸し、速やかに左心室から氷冷した PBS 30~50 mL を灌流させた。その後、4% paraformaldehyde (PFA; 和光純薬) / 0.1 M phosphate buffer 30~50 mL を同様に灌流した。固定したマウスを 4°C で一晩保存したのち、心臓および脳を摘出した。組織は、使用するまで PFA 溶液中に 4°C で保存した。心臓の組織は、20% sucrose 溶液に移した翌日、ドライアイス上で O.C.T compound (Sakura Finetek, Torrance, CA, USA) に包埋し、-80°C に保存した。心臓の染色用スライスクライオスタット (Leica Biosystems, Wetzlar, Germany) を用いて 20 μ m の厚さで作製した。マッソナートリクローム染色は、Trichrome Stain (Masson) Kit (Sigma) を用いて、メーカーのマニュアル通りに行った。

脳の染色用スライスは、マイクロトーム（堂阪イーエム、京都）を用いて 50 μm の厚さで作製した。脳スライスの染色には、以下のような操作を行った。まず、膜透過処理として 0.01% Triton X-100 / PBS を加え 30 分間室温で静置したのち、ブロッキングとして 3% bovine serum albumin (BSA; Sigma) / PBS を加え 1 時間室温で振盪した。その後、一次抗体として抗 GFAP 抗体 (Sigma) および抗 OPRS1 (Sigmar1) 抗体 (Abcam, Cambridge, UK) をそれぞれ希釈した BSA / PBS を加え、4°C で 3 日間振盪した。二次抗体として Alexa Flour 488 結合抗マウス抗体または Alexa Flour 594 結合抗ウサギ抗体 (Thermo Fisher Scientific) を希釈した BSA / PBS を加え、一日振盪した。最後に、核を DAPI (Sigma) で染色したのち、封入剤 Vectashield (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) を用いて封入を行った。観察は、共焦点顕微鏡 LSM700 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) を用いて行った。

5.10. 細胞の免疫染色、TUNEL 染色および解析

カバーガラスに張りつけた細胞は、脳組織と同様に次の一次抗体と適切な二次抗体を用いて免疫染色を行った。抗 cytochrome c 抗体 (BD biosciences, San Diego, CA, USA)、抗 LC3 抗体 (MBL, 名古屋)、抗 p62 抗体 (MBL)。なお、Alexa 488-phalloidin (Thermo Fisher Scientific) による細胞骨格の染色は、二次抗体と同じ条件で行った。また、固定直前に培養液に MitoTracker Red CMXRos (Thermo Fisher Scientific; final 20 nM) を加え、37°C、5% CO₂ 条件下で 20 分間インキュベーションすることで、ミトコンドリアの染色を行った。共焦点顕微鏡を用いて観察し、Image J を用いて、細胞の大きさや MitoTracker の蛍光強度の測定を行った。TUNEL 染色は、in situ apoptosis detection kit (タカラバイオ、滋賀) を用いて、メーカーのマニュアル通り行った。DAPI と共染

色を行い、すべての細胞 (DAPI 陽性細胞)に対するアポトーシスを起こした細胞 (TUNEL 陽性細胞)を算出し、評価した。

5.11. 組織、細胞のホモジナイズおよび免疫ブロット

ホモジナイズおよび免疫ブロットは、これまでの報告のとおり行った (Shioda N et al., 2010, Tagashira H et al., 2010)。-80°Cに保存した組織、細胞をバッファー (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.5% Triton X-100, 0.5 M NaCl, 4 mM EDTA, 4 mM EGTA, 1mM Na₃VO₄, 50 mM NaF, 1 mM DTT, 2 µg/ml pepstatin A, 1 µg/ml leupeptin, 100 nM calyculin A) でホモジナイズしたのち、4°Cで 20 分間あるいは 10 分間遠心した (15,000 rpm)。上清を回収し、Bradford 法でタンパク質濃度を定量したのち、6x Laemmli's SDS sample を加え、100°Cで 3 分間加熱した。タンパク質あたりで等量のサンプルを免疫ブロットに供した。

SDS-PAGE は、5%の濃縮ゲルと 12.5~15%の分離ゲルを用い、ゲル 1 枚当たり 40 mA の定電流で泳動した。その後、タンパク質をゲルから PVDF メンブレン (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) へ 70 V の定電圧で転写した。メンブレンを 5%スキムミルク/TTBS にてブロッキングしたのち、次の一次抗体 [抗 b-tubulin 抗体 (Sigma)、抗 OPR1 (Sigma) 抗体および抗 VDAC 抗体 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)をそれぞれ希釈した TTBS に浸し、4°Cで一晩振盪した。翌日、二次抗体として horseradish peroxidase 結合型抗ウサギ、マウス抗体を希釈した TTBS にメンブレンをひたし、室温で 1 時間振盪した。ECL detection system (GE Healthcare) により発光させ、Image Quant LAS 4000 mini (GE Healthcare)を用いて検出を行った。バンドの定量には、Multi Gauge ソフトウェア (GE Healthcare)を用いた。

5.12. 組織、細胞の ATP 含量測定

ATP の測定には、ATP assay kit (東洋インキ、東京)を用いて、メーカーのマニュアル通りに行った。まず、組織および細胞をバッファー (0.25M sucrose, 10mMHEPES-NaOH: pH 7.4) でホモジナイズを行い、4°Cで 10 分間遠心した (1,000 x g)。上清を回収し、Bradford 法により、タンパク質濃度の定量を行い、一定の濃度に希釈した。キットに付属の ATP 抽出液と混合し、室温で 30 分静置した。その後、ATP 依存性発光基質のルシフェリンを含むバッファーと混合し、即座にルミノメーター Gene Light (マイクロテック・ニチオン、船橋) を用いて、発光量 (RLU) を測定した。

5.13. Ca²⁺イメージングによる細胞質、ミトコンドリアにおける Ca²⁺レベルの測定

Ca²⁺イメージングは、過去の報告と同様に行った (Shioda N et al., 2012, Tagashira H et al., 2010)。細胞質の Ca²⁺レベルは、Fura-2 (Sigma) を用いて測定した。細胞を Fura-2 を混合した DMEM (final 2.5 μM)で 37°C、5% CO₂ 条件下で 30 分間培養し、Fura-2 を細胞に取り込ませた。洗浄ののち、Krebs-Ringer-HEPES (KRH; 150 mM NaCl, 4 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 5.6 mM glucose, 5 mM HEPES, pH 7.4) でインキュベーションし、顕微鏡による Ca²⁺レベルの測定を行った。340 nm および 380 nm の励起光に対する 530 nm の蛍光強度をそれぞれ F₃₄₀、F₃₈₀ とし、Ratio (F₃₄₀/F₃₈₀) を算出し、細胞質 Ca²⁺レベルの指標とした。測定開始後 Ratio が一定に保たれていることを確認したのち、細胞を 10 mM フェニレフリン (PE) あるいは ATP で刺激した。一過性に上昇した Ca²⁺レベルのピーク幅を定量し、比較した。

ミトコンドリア移行型 Ca プローブ、*ratiometric pericam-mt / pcDNA3* を細胞にトランスフェクションした翌日、前述のとおり細胞を Ang II、haloperidol および SA4503 で 1 時間あるいは 48 時間刺激したのち、ミトコンドリア Ca^{2+} レベルを測定した。蛍光の観察には二つの条件を用い、励起フィルター (EX) : 482 / 35、ジクロイックミラー (DM) : 506、吸収フィルター (EM) : 536 / 40 の組み合わせと EX: 414 / 46、DM: 510、EM: 527 / 20 の組み合わせで行い、それぞれの蛍光強度を F_{480} および F_{410} とした。そして、蛍光強度比 (F_{480} / F_{410}) をミトコンドリア Ca^{2+} レベルの指標として用いた。

5.14. 心室からの RNA 抽出およびリアルタイム polymerase chain reaction (PCR)

組織からの RNA 抽出および cDNA への逆転写反応は、これまでの報告と同様に行った (Shioda et al., 2010)。 -80°C のディープフリーザーから組織を取り出し、TRI Reagent (Thermo Fisher Scientific) を加え、ホモジナイズを行った。23G ニードルを 10 回通過させて組織を完全に破砕したのち、氷中で 5 分間静置した。クロロホルムを加え、15 秒間 vortex したのち、氷中で 15 分間静置した。 4°C 下で 15 分間遠心 (15,000 rpm) したのち、RNA を含む最上層を新しいエッペンドルフチューブに回収した。イソプロパノールを用いた RNA の精製を行ったのち、RNA 濃度を定量し、一定量を次の逆転写反応に用いた。逆転写反応は、Oligo (dT)¹⁵ primer (Promega, Fitchburg, WI, USA) および M MLV-RT (Thermo Fisher Scientific) を用いて、 37°C 50 分、次に 70°C 15 分の反応をサーマルサイクラー (Thermo Fisher Scientific) で行った。

リアルタイム PCR は、心肥大・不全病態のマーカーである Anp 遺伝子、変動の少ないハウスキーピング遺伝子として知られる Gapdh 遺伝子の二つにつ

いて行った。プライマーは次の 2 セットをそれぞれ用いた。Anp fw, 5'-GTCCAACACAGATCTGATGG -3'; Anp rv, 5'- GATTTGGCTGTTATCTTCGG -3'; Gapdh fw, 5'- TGTGTCCGTCGTGGATCTGA -3'; Gapdh rv, 5'- CACCACCTTCTTGATGTCATCATAC -3'。これらのプライマーと iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を用いて、サーマルサイクラー (Bio-Rad Laboratories) で行った。なお、解析は Gapdh 遺伝子を対照遺伝子として、比較 Δ Ct 法により行った。

5.15. マウス血漿コルチコステロン濃度の測定

マウスから血液を採取後、直ちに EDTA と混合したのち、4°C 下で 10 分間遠心 (1,500 x g) し、血漿を回収した。血漿サンプルは、実験に用いるまで -80°C に保存した。血漿コルチコステロン濃度の測定には、corticosterone ELISA kit (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA) を使用し、メーカーのマニュアル通りに行った。

5.16. マウスの生存率の検討

TAC 後 30 日目までの生存率は、Kaplan-Meier 法により検討した。また統計解析は、Log-rank 試験を用いた。

5.17. 統計解析

値は、平均値±標準誤差で示した。多群間の比較は、analysis of variance (ANOVA) ののち、Dunnett 検定により検討した。初代培養心筋細胞の形態解析のみ、SA4503 の効果を判定する目的で、Scheffe 検定を用いた。P < 0.05 を統計学的に有意な差があるとみなした。

謝辞

本研究を進めるにあたり、終始ご甚大なるご指導、ご鞭撻を賜りました東北大学大学院薬学研究科 薬理学分野 福永 浩司 教授に謹んで感謝申し上げます。

また、本論文を作製するにあたり、共同研究という形で多大なるご協力を賜りました東北大学大学院工学研究科 医工学研究所 金井 浩 教授、同分野 長谷川 英之 准教授（現 富山大学 教授）に厚く御礼申し上げます。

さらに、有益なるご助言を賜りました薬理学分野 塩田 倫史 特任准教授（現 岐阜薬科大学 准教授）、同分野 森口 茂樹 講師、同分野 矢吹 悌 助教、田頭 秀章 先生（現 福岡大学 講師）をはじめ、これまでの研究でご協力いただきましたすべての皆様方に御礼申し上げます。

最後に、本論文を御高閲賜りました東北大学大学院薬学研究科 衛生化学分野 松沢 厚 教授、臨床薬学分野 高橋 信行 准教授に感謝申し上げます。

参考文献

Bhuiyan MS and Fukunaga K. Stimulation of sigma-1 receptor signaling by dehydroepiandrosterone ameliorates pressure overload-induced hypertrophy and dysfunctions in ovariectomized rats. *Exp. Opin. Ther. Targets*, 13 (11) 1253-1265, 2009.

Bhuiyan MS, Tagashira H, and Fukunaga K. Targeting sigma-1 receptor with fluvoxamine ameliorates pressure-overload-induced hypertrophy and dysfunctions. *Expert Opin. Ther. Targets*, 14 (10) 1009-1022, 2010.

Bhuiyan MS, Tagashira H, and Fukunaga K. Dehydroepiandrosterone-mediated stimulation of sigma-1 receptor activates Akt-eNOS signaling in the thoracic aorta of ovariectomized rats with abdominal aortic banding. *Cardiovasc. Ther.*, 29 (4) 219-230, 2011a.

Bhuiyan MS, Tagashira H, and Fukunaga K. Sigma-1 receptor stimulation with fluvoxamine activates Akt-eNOS signaling in the thoracic aorta of ovariectomized rats with abdominal aortic banding. *Eur. J. Pharmacol.*, 650 (2-3) 621-628, 2011b.

Bhuiyan MS, Tagashira H, and Fukunaga K. Crucial interactions between selective serotonin uptake inhibitors and sigma-1 receptor in heart failure. *J. Pharmacol. Sci.*, 121 (3) 177-184, 2013.

Bowen WD, Moses EL, Tolentino PJ, and Walker JM. Metabolites of haloperidol display preferential activity at sigma receptors compared to dopamine D-2 receptors. *Eur. J. Pharmacol.*, 177 (3) 111-118, 1990.

Bradley SM and Rumsfeld JS. Depression and cardiovascular disease. *Trends Cardiovasc. Med.*, 25 (7) 614-622, 2015.

Byrne JA, Grieve DJ, Bendall JK, Li JM, Gove C, Lambeth JD, Cave AC, and Shah AM. Contrasting roles of NADPH oxidase isoforms in pressure-overload versus angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *Circ. Res.*, 93 (9) 802-805, 2003.

Cao X, Li LP, Wang Q, Wu Q, Hu HH, Zhang M, Fang YY, Zhang J, Li SJ, Xiong WC, Yan HC, Gao YB, Liu JH, Li XW, Sun LR, Zeng YN, Zhu XH, and Gao TM. Astrocyte-derived ATP modulates depressivelike behaviors. *Nat. Med.*, 19 (6) 773-777, 2013.

Chang WH, Hwu HG, Lane HY, Lin SK, Chen TY, Chen H, Wei HL, Lin WL, and Lin HN. Dose-dependent reduced haloperidol/haloperidol ratios in schizophrenic patients. *Psychiatry Res.*, 38 (3) 215-225, 1991.

Chevallier N, Keller E, and Maurice T. Behavioural phenotyping of knockout mice for the sigma-1 (σ_1) chaperone protein revealed gender-related anxiety,

depressive-like and memory alterations. *J. Psychopharm.*, 25 (7) 960-975, 2011.

Cobos EJ, del Pozo E, and Baeyens JM. Irreversible blockade of sigma-1 receptors by haloperidol and its metabolites in guinea pig and SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *J. Neurochem.*, 102 (3) 812-825, 2007.

Dammrich J and Pfeifer U. Cardiac hypertrophy in rats after supra-avalvular aortic constriction. II. Inhibition of cellular autophagy in hypertrophying cardiomyocytes. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol.*, 43 (3) 287-307, 1983.

Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG, Johnson RW, and Kelley KW. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat. Rev. Neurosci.*, 9 (1) 46-56, 2008.

de Cavanagh EM, Ferder M, Inserra F, and Ferder L. Angiotensin II, mitochondria, cytoskeletal, and extracellular matrix connections: an integrating viewpoint. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 296 (3) H550-H558, 2009.

Des Rosiers C, Labarthe F, Lloyd SG, and Chatham JC. Cardiac anaplerosis in health and disease: food for thought. *Cardiovasc. Res.*, 90 (2) 210-219, 2011.

Doenst T, Nguyen TD, and Abel ED. Cardiac metabolism in heart failure: implications beyond ATP production. *Circ Res.*, 113 (6) 709-724, 2013.

Dowlati Y, Herrmann N, Swardfager W, Liu H, Sham L, Reim EK, Lanctôt KL. A meta-analysis of cytokines in major depression. *Biol. Psychiatry.*, 67 (5) 446-457, 2010.

Eisenberger NI, Cole SW. Social neuroscience and health: neurophysiological mechanisms linking social ties with physical health. *Nat. Neurosci.*, 15 (5) 669-664, 2012.

Eyles DW and Pond SM. Stereospecific reduction of haloperidol in human tissues. *Biochem. Pharmacol.*, 44 (5) 867-871, 1992.

Fields RD and Burnstock G. Purinergic signalling in neuron-glia interactions. *Nat. Rev. Neurosci.*, 7 (6) 423-436, 2006.

Gibbs CL. Cardiac energetics. *Physiol. Rev.*, 58 (1) 174-254, 1978.

Goldenberg I, Grossman E, Jacobson KA, Shneyvays V, and Shainberg A. Angiotensin II-induced apoptosis in rat cardiomyocyte culture: a possible role of AT1 and AT2 receptors. *J. Hypertens.*, 19 (9) 1681-1689, 2001.

Gomes LC, Di Benedetto G, and Scorrano L. During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. *Nat. Cell Biol.*, 13 (5) 589-598, 2011.

Gordon GR, Baimoukhametova DV, Hewitt SA, Rajapaksha WR, Fisher TE, and Bains JS. Norepinephrine triggers release of glial ATP to increase postsynaptic efficacy. *Nat. Neurosci.*, 8 (8) 1078-1086, 2005.

Gregus A, Wintink AJ, Davis AC, and Kalynchuk LE. Effect of repeated corticosterone injections and restraint stress on anxiety and depression-like behavior in male rats. *Behav. Brain Res.*, 156 (1) 105-114, 2005.

Guder G, Bauersachs J, Frantz S, Weismann D, Alolio B, Ertl G, Angermann CE, and Störk S. Complementary and incremental mortality risk prediction by cortisol and aldosterone in chronic heart failure. *Circulation*, 115 (13) 1754-1761, 2007.

Haddad JJ, Saade NE, Safieh-Garabedian B. Cytokines and neuro-immune-endocrine interactions: a role for the hypothalamic-pituitary-adrenal revolving axis. *J. Neuroimmunol.*, 133 (1-2) 1-19, 2002.

Hanner M., Moebius FF, Flandorfer A, Knaus HG, Striessnig J, Kempner E, and Glossmann H. Purification, molecular cloning, and expression of the

mammalian sigma₁-binding site. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93 (15) 8072-8077, 1996.

Hashimoto K. Sigma-1 receptor chaperone and brain-derived neurotrophic factor: emerging links between cardiovascular disease and depression. *Prog. Neurobiol.*, 100 15-29, 2013.

Hasler G, Drevets WC, Manji HK, and Charney DS. Discovering endophenotypes for major depression. *Neuropsychopharmacology*. 29 (10) 1765-1781, 2004.

Hayashi T and Su TP. Sigma-1 receptor chaperones at the ER-mitochondrion interface regulate Ca²⁺ signaling and cell survival. *Cell*, 131 (3) 596-610, 2007.

Hermann HP, Pieske B, Schwarzmuller E, Keul J, Just H, and Hasenfuss G. Haemodynamic effects of intracoronary pyruvate in patients with congestive heart failure: an open study. *Lancet*, 353 (9161) 1321-1323, 1999.

Ito K, Hirooka Y, Matsukawa R, Nakano M, and Sunagawa K. Decreased brain sigma-1 receptor contributes to the relationship between heart failure and depression. *Cardiovasc. Res.*, 93 (1) 33-40, 2012.

Katz SD, Rao R, Berman JW, Schwarz M, Demopoulos L, Bijou R, and

LeJemtel TH. Pathophysiological correlates of increased serum tumor necrosis factor in patients with congestive heart failure. Relation to nitric oxide-dependent vasodilation in the forearm circulation. *Circulation*, 90 (1) 12-16, 1994.

Kerr PM, Suleiman MS, and Halestrap AP. Reversal of permeability transition during recovery of hearts from ischemia and its enhancement by pyruvate. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 276 (2) H496-H502, 1999.

Kishi T, Yoshimura R, Okochi T, Fukuo Y, Kitajima T, Okumura T, Tsunoka T, Kawashima K, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Umene-Nakano W, Naitoh H, Nakamura J, Ozaki N, and Iwata N. Association analysis of SIGMAR1 with major depressive disorder and SSRI response. *Neuropharmacology*, 58 (7) 1168-1173, 2010.

Koga Y, Povalko N, Katayama K, Kakimoto N, Matsuishi T, Naito E, and Tanaka M. Beneficial effect of pyruvate therapy on Leigh syndrome due to a novel mutation in PDH E1alpha gene. *Brain Dev.*, 34 (2) 87-91, 2012.

Kourrich S, Su TP, Fujimoto M, and Bonci A. The sigma-1 receptor: roles in neuronal plasticity and disease. *Trend. Neurosci.*, 35 (12) 762-771, 2012.

Martin WR, Eades CC, Thompson JA, Huppler RE, and Gilbert PE. The effects of morphine- and nalorphine- like drugs in the nondependent and

morphine-dependent chronic spinal dog. *J Pharmacol. Exp. Ther.*, 197 (3) 517-532, 1976.

Matsumoto RR and Pouw B. Correlation between neuroleptic binding to $\alpha 1$ and $\alpha 2$ receptors and acute dystonic reactions. *Eur. J. Pharmacol.*, 401 (2) 155-160, 2000.

Mavlyutov TA, Epstein ML, Andersen KA, Ziskind-Conhaim L, and Ruoho AE. The Sigma-1 Receptor is Enriched in Postsynaptic Sites of C-terminals in mouse motoneurons, an anatomical and behavioral study. *Neuroscience*, 167 (2) 247-255, 2010.

Meyer-Massetti C, Cheng CM, Sharpe BA, Meier CR, and Guglielmo BJ. The FDA extended warning for intravenous haloperidol and torsades de pointes: how should institutions respond? *J. Hosp. Med.*, 5 (4) E8-E16, 2010.

Nagai T, Sawano A, Park ES, and Miyawaki A. Circularly permuted green fluorescent proteins engineered to sense Ca^{2+} . *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 98 (6) 3197-3202, 2011.

Nakai A, Yamaguchi O, Takeda T, Higuchi Y, Hikoso S, Taniike M, Omiya S, Mizote I, Matsumura Y, Asahi M, Nishida K, Hori M, Mizushima N, and Otsu K. The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress. *Nat. Med.*, 13 (5) 619-624, 2007.

Nemeroff CB, Widerlov E, Bissette G, Walleus H, Karlsson I, Eklund K, Kilts CD, Loosen PT, and Vale W. Elevated concentrations of CSF corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in depressed patients. *Science*, 226 (4680) 1342-1344, 1984.

Ohi K, Hashimoto R, Yasuda Y, Fukumoto M, Yamamori H, Umeda-Yano S, Kamino K, Ikezawa K, Azechi M, Iwase M, Kazui H, Kasai K, and Takeda M. The SIGMAR1 gene is associated with a risk of schizophrenia and activation of the prefrontal cortex. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 35 (5) 1309-1315, 2011.

Porsolt RD, Le Pichon M, and Jalfre M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*, 266 (5604) 730-732, 1977.

Prasad PD, Li HW, Fei YJ, Ganapathy ME, Fujita T, Plumley LH, Yang-Feng TL, Leibach FH, and Ganapathy V. Exon-Intron Structure, Analysis of Promoter Region, and Chromosomal Localization of the Human Type 1 σ Receptor Gene. *J. Neurochem.*, 70 (2) 443-451, 1998

Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griending KK, and Harrison DG. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J. Clin. Invest.*, 97

(8) 1916-1923, 1996.

Reul JM and de Kloet ER. Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology*, 117 (6) 2505-2511, 1985.

Reynolds GP, Brown JE, and Middlemiss DN. [³H]Ditolyguanidine binding to human brain σ sites is diminished after haloperidol treatment. *Eur. J. Pharmacol.*, 194 (2-3) 235-236, 1991.

Rockman HA, Ross RS, Harris AN, Knowlton KU, Steinhilper ME, Field LJ, Ross J Jr, and Chien KR. Segregation of atrial-specific and inducible expression of an atrial natriuretic factor transgene in an in vivo murine model of cardiac hypertrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88 (21) 8277-8281, 1991.

Rumsfeld JS, Havranek E, Masoudi FA, Peterson ED, Jones P, Tooley JF, Krumholz HM, and Spertus JA; Cardiovascular Outcomes Research Consortium. Cardiovascular Outcomes Research Consortium. Depressive symptoms are the strongest predictors of short-term declines in health status in patients with heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 42 (10) 1811-1817, 2003.

Rumsfeld JS and Ho PM. Depression and cardiovascular disease: a call for recognition. *Circulation*, 111 (3) 250-253, 2005.

Sabino V, Cottone P, Parylak SL, Steardo L, and Zorrilla EP. Sigma-1 receptor knockout mice display a depressive-like phenotype. *Behav. Brains Res.*, 198 (2) 472-476, 2009.

Sagara Y. Induction of reactive oxygen species in neurons by haloperidol. *J. Neurochem.*, 71 (3) 1002-1012, 1998.

Seth P, Leibach FH, and Ganapathy V. Cloning and Structural Analysis of the cDNA and the Gene Encoding the Murine Type 1 Sigma Receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 241 (2) 535-540, 1997.

Shioda N, Yamamoto Y, Watanabe M, Binas B, Owada Y, and Fukunaga K. Heart-type fatty acid binding protein regulates dopamine D₂ receptor function in mouse brain. *J. Neurosci.*, 30 (8) 3146-3155, 2010.

Shioda N, Ishikawa K, Tagashira H, Ishizuka T, Yawo H, and Fukunaga K. Expression of a truncated form of the endoplasmic reticulum chaperone protein σ 1 receptor, promotes mitochondrial energy depletion and apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 287 (28) 23318-23331, 2012.

Sivrioglu EY, Kirli S, Sipahioglu D, Gursoy B, and Sarandol E. The impact of omega-3 fatty acids, vitamins E and C supplementation on treatment outcome and side effects in schizophrenia patients treated with haloperidol:

an open-label pilot study. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 31 (7) 1493-1499, 2007.

Steru L, Chermat R, Thierry B, and Simon P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology (Berl)*, 85 (3) 367-370, 1985.

Suga H. Ventricular energetics. *Physiol. Rev.*, 70 (2) 247-277, 1990.

Su TP, Hayashi T, Maurice T, Buch S, and Ruoho AE. The sigma-1 receptor chaperone as inter-organelle signaling modulator. *Trend. Pharmacol. Sci.*, 31 (12) 557-566, 2010.

Su TP, Su TC, Nakamura Y, and Tsai SY. The Sigma-1 Receptor as a Pluripotential Modulator in Living Systems. *Trend. Pharmacol. Sci.*, 37 (4) 262-278, 2016.

Tagashira H, Bhuiyan S, Shioda N, Hasegawa H, Kanai H, and Fukunaga K. σ 1-Receptor stimulation with fluvoxamine ameliorates transverse aortic constriction-induced myocardial hypertrophy and dysfunction in mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 299 (5) H1535-H1545, 2010.

Tagashira H, Bhuiyan MS, Shioda N, and Fukunaga K. Distinct cardioprotective effects of 17 β -estradiol and dehydroepiandrosterone on

pressure-overload-induced hypertrophy in ovariectomized female rats.

Menopause, 18 (12) 1317-1326, 2011.

Tagashira H, Bhuiyan MS, and Fukunaga K. Diverse regulation of IP₃ and ryanodine receptors by pentazocine through sigma1-receptor in cardiomyocytes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 305 (8) H1201-H1212, 2013a.

Tagashira H, Zhang C, Lu YM, Hasegawa H, Kanai H, Han F, and Fukunaga K. Stimulation of σ_1 -receptor restores abnormal mitochondrial Ca²⁺ mobilization and ATP production following cardiac hypertrophy. *Biochim. Biophys. Acta*, 1830 (4) 3082-3094, 2013b.

Tagashira H, Matsumoto T, Taguchi K, Zhang C, Han F, Ishida K, Nemoto S, Kobayashi T, and Fukunaga K. Vascular endothelial σ_1 -receptor stimulation with SA4503 rescues aortic relaxation via Akt/eNOS signaling in ovariectomized rats with aortic banding. *Circ. J.*, 77 (11) 2831-2840, 2013c.

Tagashira H, Bhuiyan MS, Shioda N, and Fukunaga K. Fluvoxamine rescues mitochondrial Ca²⁺ transport and ATP production through σ_1 -receptor in hypertrophic cardiomyocytes. *Life Sci.*, 95 (2) 89-100, 2014.

Tam SW and Cook L. Sigma opiates and certain antipsychotic drugs mutually inhibit (+)-[3H] SKF 10,047 and [3H]haloperidol binding in guinea

pig brain membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 81 (17) 5618-5621, 1984.

Tanaka M, Nishigaki Y, Fuku N, Ibi T, Sahashi K, and Koga Y. Therapeutic potential of pyruvate therapy for mitochondrial diseases. *Mitochondrion*, 7 (6) 399-401, 2007.

Taylor CB, Youngblood ME, Catellier D, Veith RC, Carney RM, Burg MM, Kaufmann PG, Shuster J, Mellman T, Blumenthal JA, Krishnan R, and Jaffe AS; ENRICHD Investigators. Effects of antidepressant medication on morbidity and mortality in depressed patients after myocardial infarction. *Arch. Gen. Psychiatry*, 62 (7) 792-798, 2006.

Tsigos C and Chrousos GP. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J. Psychosom. Res.*, 53 (4) 865-871, 2002.

Ullah MI, Ahmad A, Raza SI, Amar A, Ali A, Bhatti A, John P, Mohyuddin A, Ahmad W, and Hassan MJ. In silico analysis of SIGMAR1 variant (rs4879809) segregating in a consanguineous Pakistani family showing amyotrophic lateral sclerosis without frontotemporal lobar dementia. *Neurogenetics*, 16 (4) 299-306, 2015.

Wei L, MacDonald TM, Walker BR. Taking glucocorticoids by prescription is associated with subsequent cardiovascular disease. *Ann. Intern. Med.*, 141 (10) 764-770, 2004.

Wilson L, Yang Q, Szustakowski JD, Gullicksen PS, and Halse R. Pyruvate induces mitochondrial biogenesis by a PGC-1 alpha-independent mechanism. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, 292 (5) C1599-C1605, 2007.

Yamaji M, Tsutamoto T, Kawahara C, Nishiyama K, Yamamoto T, Fujii M, and Horie M. Serum cortisol as a useful predictor of cardiac events in patients with chronic heart failure: the impact of oxidative stress. *Circ. Heart Fail.*, 2 (6) 608-615, 2009.

Yan L, Vatner DE, Kim SJ, Ge H, Masurekar M, Massover WH, Yang G, Matsui Y, Sadoshima J, and Vatner SF. Autophagy in chronically ischemic myocardium. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 102 (39) 13807-13812, 2005.

Zunszain PA, Anacker C, Cattaneo A, Carvalho LA, Pariante CM. Glucocorticoids, cytokines and brain abnormalities in depression. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.*, 35 (3) 722-729, 2011.

発表論文リスト

本学位論文は、下記の原著論文を基に作成されたものである。

1. **Shinoda Y**, Tagashira H, Bhuiyan MS, Hasegawa H, Kanai H, and Fukunaga K.

Haloperidol aggravates transverse aortic constriction-induced heart failure via mitochondrial dysfunction.

J. Pharmacol. Sci., 131 (3) 172-183, 2016.

2. **Shinoda Y**, Tagashira H, Bhuiyan MS, Hasegawa H, Kanai H, Zhang C, Han F, and Fukunaga K.

Corticosteroids Mediate Heart Failure-induced Depression through Reduced σ_1 -receptor expression.

PLoS One, 11 (10) e0163992, 2016.