

電気けいれん処置が成体ラット海馬でのエンドサイ  
トーシス、細胞内小胞輸送機構ならびに  
BDNF/TrkB シグナルに及ぼす影響についての検討

えのもと しんご  
榎本 真悟

(精神科学専攻)

防衛医科大学校

平成30年度

## 目次

I. 導入 .....	1
II. ECS がエンドサイトーシス関連・エンドソーム関連蛋白発現に及ぼす影響 .....	4
II-1. はじめに.....	4
II-2. 方法 .....	6
II-3. 結果 .....	9
II-4. 考察 .....	11
III. ECS が BDNF/TrkB シグナルに及ぼす影響 .....	14
III-1. はじめに .....	14
III-2. 方法.....	16
III-3. 結果 .....	19
III-4. 考察 .....	23
IV. 結論 .....	25
謝辞.....	26
単語・略語説明 .....	27
引用文献 .....	28
図及びグラフ等 .....	38

## I. 導入

うつ病の病態仮説として、脳内の細胞間隙におけるモノアミン（ドパミン、ノルアドレナリン、セロトニン）の減少が原因であるというモノアミン仮説が当初提唱された<sup>1</sup>。しかし、セロトニントランスポーター及びノルアドレナリントランスポーター再取り込み阻害作用を有する抗うつ薬が、投与後すぐに細胞間隙でのモノアミン濃度を上昇させるにもかかわらず、抗うつ効果が現れるには1-2週間程度の時間を必要とするという矛盾があった。やがて、多くの抗うつ薬が1-2週間の慢性投与により、ノルアドレナリン $\beta_1$ 受容体のダウンレギュレーション（受容体の結合能あるいは数が減る）を起こすことが発見され<sup>2</sup>、うつ病の病態解明の鍵を握る受容体機能変化として注目された。しかし受容体機能変化の背景にどのような生化学的メカニズムがあり、ダウンレギュレーションがなぜ抑うつ症状の改善につながるのかは解明されなかった。

やがて、げっ歯類を用いたうつ病動物モデル研究で、海馬の体積が減少することが多数報告されるようになった<sup>3,4</sup>。うつ病の兆候を示す動物の海馬は委縮する一方、抗うつ薬で回復すると海馬委縮は回復する。ヒトにおいても、死後脳の研究や画像研究で、海馬委縮が多数指摘された<sup>5,6</sup>。しかも罹病期間が長く、重症度が高いほど委縮が強い傾向を認めた<sup>7,8</sup>。海馬委縮の背景には、海馬歯状回での神経新生の減少、神経突起分枝の退縮があり、それによってシナプス数が減少し海馬機能が低下することがうつ病の病態生理に大きく関係しており、海馬機能の回復がうつ病治

療に重要であると認識されるようになった<sup>9</sup>。

電気けいれん療法 (Electroconvulsive therapy : 以下 ECT) は、重症または薬物治療抵抗性うつ病に対して効果的な治療法であり<sup>10,11</sup>、ECTにより海馬体積は増加する<sup>12</sup>。ECTの動物モデルである電気けいれん処置 (Electroconvulsive shock : 以下 ECS) を用いた研究では、ECSによる海馬での神経新生の増加<sup>13</sup>、神経突起分枝の増加<sup>14</sup>、シナプス数の増加<sup>15</sup>、が報告されている。また、うつ病の治療機序の背景として注目されたノルアドレナリン  $\beta_1$  受容体のダウンレギュレーションも、ECSによって海馬で引き起こされる<sup>16</sup>。このような海馬の構造及び機能変化は、ECTの治療機序に深く関与していると考えられるが、これらの変化がどのような分子メカニズムで引き起こされているかは、十分には分かっていない。

エンドサイトーシス及び後続するエンドソームを介した細胞内小胞輸送機構は、細胞膜上における受容体の数と局在に変化をもたらすとともに、神経細胞の極性形成や神経突起分枝の伸長にも関与する機構であることが報告されている<sup>17</sup>。これらの機構の活性化が、ECTによる海馬機能の回復に関与している可能性を考え、今回の研究テーマの一つとした。

また、ECTによる海馬の構造変化の鍵となる分子として、これまでに繰り返し報告されているのが、神経栄養因子の一つである brain-derived neurotrophic factor (以下 BDNF) である<sup>18,19,20</sup>。BDNFはその受容体である tropomyosin receptor kinaseB (以下 TrkB) をリン酸化することで神経細胞の分化促進、神経保護作用を発

揮する<sup>21</sup>が、ECTによるBDNF/TrkBシグナルの変動について詳しく調べた研究はなく、これについても今回の研究テーマとした。

## エンドサイトーシスと小胞輸送機構(図1)

エンドサイトーシスの際、細胞膜の一部が分離し、対象物質を囲む形で細胞内で小胞を形成する。clathrinはその時に小胞の外側を裏打ちする蛋白である<sup>22</sup>。caveolin-1、flotillin-1は密集して細胞膜に凹みを形成させる蛋白である<sup>23</sup>(図1のA)。caveolin-1、flotillin-1は、細胞膜の中でコレステロールとスフィンゴ脂質に富んだ脂質ラフトと呼ばれる領域に局在して、エンドサイトーシスに関わると考えられている<sup>23</sup>。一方でclathrinは細胞膜上で脂質ラフト以外の領域に局在してエンドサイトーシスに関わる<sup>22</sup>(図1のB)。細胞内に取り込まれた物質は、early endosomeに集簇した後、小胞輸送機構によって細胞内を運ばれていく。主な輸送経路として、rapid recycling endosomeを介して細胞膜に素早く戻る経路(rapid recycling pathway)、slow recycling endosomeを介して細胞膜へ時間をかけて戻る経路(slow recycling pathway)、early endosomeが成熟してlate endosomeとなった後にlysosomeと融合して分解される経路(degrading pathway)がある。RAB蛋白質(以下RAB)は、この小胞輸送機構において極めて重要な制御因子である。RAB5はearly endosomeに、RAB4はrapid recycling endosomeに、RAB11はslow recycling endosomeに、RAB7はlate endosomeに局在して小胞輸送に関

与している<sup>24</sup> (図 1 の C)。

## BDNF/TrkB シグナルの概要 (図 2)

成熟型 BDNF は 119 個のアミノ酸からなるポリペプチド(分子量 14,000)で、ニューロトロフィンファミリーに属する神経栄養因子である。成熟型 BDNF は神経細胞の生存維持、神経突起の伸長、神経伝達物質の合成促進などの作用を示す<sup>25,26</sup>。一方で前駆体である proBDNF(分子量 32,000)は受容体である p75NTR に作用して神経活動抑制<sup>27</sup>、アポトーシス誘導に働く<sup>28</sup>。TrkB は BDNF の受容体であるが、alternative splicing により full length TrkB(分子量 145,000)と truncated TrkB(分子量 95,000)の 2 種類が存在する。full length TrkB は細胞内にチロシンキナーゼを持つが truncated TrkB はチロシンキナーゼを持たない<sup>29</sup>。成熟型 BDNF と結合した full length TrkB が自己リン酸化されることで、上記の神経保護効果に関与する生理反応が起こる。truncated TrkB については、細胞形態の制御や細胞内カルシウム濃度上昇に関与しているとする報告<sup>30,31</sup>があるが、その機能は十分には解明されていない。

## II. 実験 1 ECS がエンドサイトーシス関連・エンドソーム関連蛋白に及ぼす影響

### II-1. はじめに

神経細胞が発達過程で神経突起を伸長させるためには、受容体を含む機能蛋白が細胞

膜上の適切な区画に挿入されることと同時に、不要になった蛋白が膜上から取り除かれることが必要とされる<sup>17</sup>。突起が方向性を持って伸長していくためには、trans Golgi network を経ての細胞膜への順行性の輸送のみならず、recycling endosome を経ての細胞膜への輸送も重要となる。RAB11 は slow recycling endosome に局在し、神経栄養因子の刺激を受けて突起を形成する機能を有する蛋白と相互作用し、それを細胞膜へ輸送することで、方向性を持った神経突起の形成に関与することが報告されている<sup>32</sup>。細胞膜への recycling に加えて、不要になった蛋白を膜状から取り除き分解することも、神経突起とシナプスが適切に形成されていく上で重要と考えられる。RAB7 は late endosome に局在し、不要物質をライソソームに輸送し分解することに関わる。RAB7 が十分に機能せず不要物質の分解が不十分な状態で、もし突起やシナプスの形成が続けば、やがては代謝不全に至るかも知れない。

本研究において、エンドサイトーシス及び細胞内小胞輸送機構の活性化が、ECS による海馬機能回復のメカニズムの一端を担っていることを予想した。本研究で 10 日間の ECS による成体ラット海馬全域でのエンドサイトーシス関連蛋白 (clathrin heavy chain、clathrin light chain、caveolin-1、flotillin-1) 及びエンドソーム関連蛋白 (RAB5、RAB4、RAB11、RAB7) の発現変動を調べた。非イオン性の界面活性剤に対して不溶性である<sup>33</sup>脂質ラフトに局在して機能する caveolin-1 と flotillin-1 については、ECS によるエンドサイトーシスの変動を詳細に示すために、ショ糖密度勾配遠心法により分離した脂質ラフト分画における発現変動も調べた。

## II-2. 方法

### 動物

6週齢の雄 Sprague-Dawley rat (クレア社、東京) を、1 ケージにつき 4~5 匹、一定環境 (室温 21°C ; 湿度 55%~65% ; 明期 08 : 00~20 : 00) 、水及び餌を自由摂取できる環境で飼育した。処置は、the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (<http://grants.nih.gov/grants/olaw/Guide-for-the-Care-and-Use-of-Laboratory-Animals.pdf>) に従った。また防衛医科大学校の動物実験倫理委員会で承認のうえ施行した。

### ECS プロトコル

ラットに対して 10 日間、両耳をリングピンセット (リング内径 5 mm) が先についている電極で挟み 1 日 1 回 0.5 秒の通電 (最初の 5 日間は 40 mA その後 5 日間は 50 mA) を定電流発生器 (室町機械、東京) により与え 20 秒程度持続する典型的強直-間代発作を誘発させた<sup>19,34</sup>。偽 ECS を与えた群は両側の耳を ECS 群と同様の時間電極で挟んだのみで通電は行わなかった。蛋白の分析のため、最終処置の 4 時間後に脳サンプルの採取を行った。

### ウエスタンブロット法



脳を氷冷した 1×Phosphate buffered saline(以下 PBS)にて洗浄した後、全海馬領域を摘出し、50 mM Tris、150 mM NaCl、2 mM EDTA、1% TritonX-100、10 µg/ml アプロチニン溶液にてホモジナイズした。30 分間氷上にて保温した後、ホモジナイズした細胞を 4°C で 10 分間、1000×g で遠心分離した。上清を回収し、その蛋白含有量を Protein Assay Reagent Kit(Thermo Scientific、Rockford、IL、USA)を使用して測定した。蛋白含有量を等しくした上で、Laemmli sample buffer(Bio-Rad Laboratories、Hercules、CA、USA)を用いて希釈し、3 分間沸騰させた後氷冷した。サンプルを 25 mM Tris、192 mM glycine、0.1%ドデシル硫酸ナトリウム緩衝液を用い、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲルを使用して電気泳動を行った後、30 分間、20 V にてニトロセルロースメンブレン(pore size 0.2 µm、Thermo Fisher Scientific Inc)に転写した。転写はセミドライ式転写装置(Trans-blot、Bio-Rad laboratories、Inc)を用いて、48 mM Tris、38 mM glycine、20%メタノールを転写バッファーとした。メンブレンのブロッキングは 5%スキムミルク、0.1% Tween 20、1×PBS を用いて、室温 1 時間行った。その後、1 次抗体を追加し 4°C、一晩、1×PBS、5%ウシ血清アルブミン (BSA)、0.1% Tween 20 の溶液上で抗原抗体反応を行った。各 1 次抗体は以下のものを使用した。ウサギ抗 caveolin-1 抗体(#3627、Cell Signaling Technology Inc、1 : 500 希釈)、ウサギ抗 flotillin-1 抗体(#18634、Cell Signaling Technology Inc、1 : 1000 希釈)、ウサギ抗 clathrin heavy chain 抗体 (#4796、Cell signaling Technology Inc、1 : 1000 希釈)、マウス抗 clathrin light chain 抗体

(#ab150658、Abcam、1:1000 希釈)、ウサギ抗 RAB4 抗体 (#2167、Cell Signaling Technology Inc、1:2000 希釈)、ウサギ抗 RAB5 抗体 (#3547、Cell Signaling Technology Inc、1:2000 希釈)、ウサギ抗 RAB7 抗体 (#9367、Cell signaling Technology Inc、1:2000 希釈)、ウサギ抗 RAB11 抗体 (#5589、Cell signaling Technology Inc、1:2000 希釈)。メンブレンを洗浄後、2 次抗体として Horseradish peroxidase (HRP) にて標識された抗マウス IgG 抗体 (NA9310、Amersham Biosciences、1:1000 希釈)、または HRP にて標識された抗ウサギ IgG 抗体 (#7074、Cell Signaling Technology Inc、1:5000 希釈) を用いて、室温 1 時間で反応させた。β アクチンまたはグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) でウエスタンブロット法を行うため、メンブレンを標準的な方法でストリッピングした後、ウサギ抗 β アクチン抗体 (#5125、Cell Signaling Technology Inc、1:5000 希釈) またはウサギ抗 GAPDH 抗体 (#5174、Cell Signaling Technology Inc、1:5000 希釈) にてリプローブした。該当バンドを、化学発光法 (ECL 検出キット (GE Healthcare)) にて検出した。flotillin-1 は感度の高い検出キット (ECL select、GE Healthcare) にて検出し、その他の蛋白はより感度の低い検出キット (ECL prime、GE Healthcare) で検出した。上記方法により対照群と ECS 群をそれぞれ 1 枚のゲルにて、泳動・転写した。イメージアナライザー (LAS-3000、Fuji film corporation、東京、日本) で撮影した写真をスキャナーにて読み取り、ImageJ を用いて各バンドを面積×密度により定量した。この際のバンドの密度は背景の密度を引いたものである。内部

標準物質である  $\beta$  アクチンのバンドの面積×密度に対する clathrin heavy chain、clathrin light chain、caveolin-1、RAB4、RAB5、RAB7、RAB11 のバンドの面積×密度の比を求め標準化した。GAPDH のバンドの面積×密度に対する flotillin-1 のバンドの面積×密度の比を求め標準化した。その後、対照群の標準化した各バンドの定量値の平均値に対する、対照群及び ECS 群の標準化した各バンド定量値の%を算出した。

### 脂質ラフト分画の分離

MES buffer (25 mM 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid、150 mM NaCl) でスクロースを溶解し、濃度 80%、35%、5% のスクロース溶液をそれぞれ作成した。脳を氷冷した 1×PBS にて洗浄した後、全海馬領域を摘出し、50 mM Tris、150 mM NaCl、2 mM EDTA、1% Triton X-100、10  $\mu$ g/ml アプロチニン溶液にて溶解した。その溶液 1 ml に 80%スクロース溶液を 1 ml を加え混合した。この溶液に 35%スクロース溶液を 8 ml、5%スクロース溶液を 2 ml 重層した後、4°C で 19 時間、250,000×G にて遠心した。1 ml ごとに密度の異なる 12 の分画を回収し、各分画の蛋白含有量を Protein Assay Reagent Kit (Thermo Scientific、Rockford、IL、USA) を使用して測定した。12 の分画の蛋白含有量を等しくした上でウエスタンブロット法を実施した。

### II-3. 結果

10 日間の ECS が海馬全域でのエンドサイトーシス関連蛋白発現に与える影響 (図 3)

clathrin heavy chain 蛋白質量は、対照群 (n=7) の  $100 \pm 17\%$  に対し 10 日間 ECS 処置群 (n=7) は  $148 \pm 8\%$  であり、Student の t 検定で有意に増加していた ( $t_{12}=2.5$ ,  $p < 0.05$ )。

clathrin light chain 蛋白質量は、対照群 (n=7) の  $100 \pm 8\%$  に対し 10 日間 ECS 処置群 (n=7) は  $158 \pm 23\%$  であり、Student の t 検定で有意に増加していた ( $t_{12}=2.3$ ,  $p < 0.05$ )。

flotillin-1 蛋白質量は、対照群 (n=7) の  $100 \pm 10\%$  に対し 10 日間 ECS 処置群 (n=7) は、 $136 \pm 11\%$  であり、Student の t 検定で有意に増加していた ( $t_{12}=2.3$ ,  $p < 0.05$ )。

caveolin-1 蛋白質量は、対照群 (n=7) の  $100 \pm 13\%$  に対し 10 日間 ECS 処置群 (n=7) は  $182 \pm 13\%$  であり、Student の t 検定で有意に増加していた ( $t_{12}=4.9$ ,  $p < 0.05$ )。これらにより、10 日間の ECS によって海馬でエンドサイトーシスが活性化する可能性が示された。

#### 10 日間の ECS が海馬の脂質ラフト分画におけるエンドサイトーシス関連蛋白発現に与える影響 (図 4)

シヨ糖密度勾配遠心法により分離された 12 の分画のうち、主に低密度順で 3-5 番目の分画に flotillin-1、caveolin-1 が検出された。flotillin-1 蛋白質量は、対照群 (n=7) の  $100 \pm 15\%$  に対し 10 日間 ECS 処置群 (n=7) は  $181 \pm 8\%$  であり、Student の t 検定で有意に増加していた ( $t_8=3.5$ ,  $p < 0.01$ )。caveolin-1 蛋白質量は、対照群 (n=7) の  $100 \pm 14\%$  に対し 10 日間 ECS 処置群 (n=7) は  $181 \pm 20\%$  であり、Student の t 検定で有意に増加していた ( $t_8=3.3$ ,  $p < 0.05$ )。エンドサイトーシスは細胞膜上で起こることから、これらの結

果により、10日間のECSによるエンドサイトーシスの活性化がより強く示された。

#### 10日間のECSが海馬全域でのエンドソーム関連蛋白発現に与える影響 (図5)

RAB5蛋白量は、対照群(n=7)において $100 \pm 8\%$ であるのに対し、10日間ECS処置群(n=7)は $147 \pm 9\%$ であり、Studentのt検定で有意に増加していた( $t_{12}=6.2$ 、 $p < 0.05$ )。

RAB7蛋白量は、対照群(n=7)において $100 \pm 4\%$ であるのに対し、10日間ECS処置群(n=7)は $130 \pm 3\%$ であり、Studentのt検定で有意に増加していた( $t_{12}=2.5$ 、 $p < 0.05$ )。

RAB11蛋白量は、対照群(n=7)において $100 \pm 10\%$ であるのに対し、10日間ECS処置群(n=7)は $124 \pm 5\%$ であり、Studentのt検定で有意に増加していた( $t_{12}=3.0$ 、 $p < 0.05$ )。

RAB4蛋白量は、対照群(n=7)において $100 \pm 8\%$ であるのに対し10日間ECS処置群(n=7)は $134 \pm 6\%$ であり、Studentのt検定で有意に増加していた( $t_{12}=3.4$ 、 $p < 0.05$ )。これらにより、10日間ECSによって、細胞内での小胞輸送が広範囲に活性化していることが示された。

#### II-4. 考察

本研究は、電気けいれん処置による海馬領域での、エンドサイトーシス及び細胞内小胞輸送機構に関連する蛋白の発現変動を調べた初めての研究である。ヒトに対するECTでは、発作が治療効果につながる適切なものであるかどうかの指標に、一定以上の発作時間(運動発作20秒、65歳以上では15秒)を認めることが挙げられている<sup>35</sup>。うつ病

モデル動物に複数回の ECS を施行してうつ病関連行動を改善させた先行研究では、目視で強直間代発作が確認出来ることを ECS が適切に施行出来たかどうかの指標に用いている<sup>36</sup>。本研究で用いた ECS の電気刺激量は、試行回数を重ねても約 20 秒の強直間代発作を安定して生起させることから、ECT の動物モデルと妥当であると考えられる。ECT はうつ病に対する治療法であるが、本研究ではうつ病モデル動物ではなく通常の実験動物に ECS を施行した。ECT による海馬機能回復の分子メカニズムの一端を解明することが研究の目的であり、ECS は通常の実験動物に施行した場合も海馬の構造変化を引き起こす<sup>13, 14, 15</sup>。一方で、うつ病モデル動物であるか否かで ECS に対する生化学的な反応性が異なるかどうかは明らかでないためである。本研究では、10 日間の ECS によりラット海馬で、エンドサイトーシス関連蛋白 (clathrin heavy chain、clathrin light chain、caveolin-1、flotillin-1) 及びエンドソーム関連蛋白 (RAB5、RAB7、RAB11、RAB4) の発現が増加した。脂質ラフト上で機能する caveolin-1、flotillin-1 は海馬全域のみならずラフト分画でも発現が上昇していた。clathrin は非脂質ラフト領域に存在し、heavy chain と light chain の複合体が 3 量体を形成して機能する。heavy chain と light chain の両方がエンドサイトーシスの際の小胞形成に関与することが報告されている<sup>37</sup>。また、複数回の ECS により、ラット海馬でオートファジー関連蛋白 (LC3-II、Atg5-12 複合体) の発現が増加することが先行研究で示されている<sup>34</sup>。オートファジーは細胞内の不要物質をオートファゴゾームと呼ばれる二重膜構造で取り込んだ後、ライソソームへと運搬し分解する小胞輸送機構の一つである。先行研究と本研究の結果を合わせて考え

ると、複数回の ECS により小胞輸送機構が広範囲に活性化されることが示唆されたことになる。

AMPA 型グルタミン酸受容体はシナプス後膜に存在し、シナプス後膜の AMPA 型グルタミン酸受容体数の増加はシナプス伝達を促進する一方で、受容体数の減少はシナプス伝達を抑制する<sup>38,39</sup>。慢性ストレスを負荷されたラットは海馬でのシナプス伝達が抑制されるが、ECS はそれを正常化する、という報告がある<sup>40</sup>。AMPA 型グルタミン酸受容体のシナプスへの輸送には RAB4、RAB11 を介した recycling pathway が大きく関与する<sup>39</sup>ことから、ECS によるこれらの経路の活性化は、シナプス後膜の AMPA 型グルタミン酸受容体数を調節して、シナプス伝達効率の正常化に関与する可能性がある。

複数回の ECS により、海馬で  $\beta_1$  ノルアドレナリン受容体のダウンレギュレーションが起こる<sup>16</sup> ことに加えて、前頭前野では転写物および翻訳物が減少することが報告されている<sup>41</sup>。アゴニストによって誘発される受容体のダウンレギュレーションは、ホメオスタシス維持のためのメカニズムと考えられる。ECS は脳内の細胞間隙のノルアドレナリンを増加させる処置である<sup>42</sup>ことを考えると、これらは過剰なノルアドレナリン/ $\beta_1$  受容体シグナルに対する代償的な応答であり、エンドサイトーシス及び RAB5、RAB7 を介した degrading pathway の活性化がダウンレギュレーションに関与している可能性がある。

Nerve growth factor (以下 NGF) は神経栄養因子の一つであり、軸索末端で受容体である TrkA に結合した後に clathrin 依存性にエンドサイトーシスされ、軸索を逆行

性に輸送された後、細胞体のライソソームで分解される<sup>43</sup>。輸送されてる間、神経突起形成のためのシグナル伝達が持続する<sup>44</sup>。ECSは海馬でNGFの発現を増加させることが知られている<sup>45</sup>。NGF/TrkAシグナルの下流で、RAB11を介するrecycling pathwayが方向性を持った突起の伸長に寄与するという報告があり<sup>32</sup>、ECSによるrecycling pathwayの活性化が神経突起の伸長に方向性を与えると同時に、degrading pathwayの活性化がNGF/TrkAシグナルが過剰にならないよう調節することで、適切な構造変化が促進されている可能性がある。

ECTの作用機序のメカニズムの新たな候補として、エンドサイトーシスと小胞輸送機構に本研究で初めて着目した。神経突起やシナプス形成のために必要な物質の細胞膜上への輸送と、膜上の蛋白のエンドサイトーシス及び細胞質内での分解が協調して起こることによって、抗うつ効果に必要な構造変化が海馬で生じる、と推測する。

### III. 実験2 ECSがBDNF/TrkBシグナルに及ぼす影響

#### III-1. はじめに

これまでに多くの研究から、BDNFがうつ病の病態に関与していることが明らかとなってきた。うつ病患者の血清BDNF濃度は有意に低いことが多くの研究者に追試験され、メタ解析でも証明されている<sup>46</sup>。うつ病モデル動物の海馬ではBDNF蛋白発現が減少していることが報告されている<sup>47</sup>。逆に複数回のECSにより、海馬でBDNF mRNA、TrkB mRNA、成熟型BDNF蛋白の発現が増加することが示されている<sup>18,19</sup>。成熟型BDNF



の発現上昇に伴う、海馬でのシナプス新生の増加<sup>48</sup>、神経突起分枝の増加<sup>49</sup>は、ECTの治療効果のメカニズムの有力な候補である。しかしながら、成熟型 BDNF は神経保護的に作用するばかりでなく、過剰な BDNF シグナルは神経細胞の興奮性を高め、てんかん活動性を増強させる<sup>50</sup>。BDNF を海馬内に 4 日間隔で 3 回投与した場合、full length TrkB 及びリン酸化 full length TrkB の発現量が変化せず、てんかん活動性が誘発される一方で、BDNF を 2 週間かけて持続的に海馬内に投与すると、てんかん活動性は誘発されずに full length TrkB、リン酸化 full length TrkB ともに発現量が減少したという報告がある<sup>51</sup>。このことは、BDNF の段階的・持続的増加に対して、有害事象回避のための代償変化が起きていることを示唆している。反対に慢性ストレスを負荷した場合は、full length TrkB 転写物の発現量が増加する一方で、truncated TrkB 転写物の発現量は変化しないことが報告されている<sup>52</sup>。これはストレスによる BDNF 低下に対する代償変化と考えられる。ECT は試行回数を重ねることにより治療効果を発揮する処置であることから、複数回の ECS によって成熟型 BDNF が段階的・持続的に増加すると共に、代償変化が起こること、逆に ECS の施行回数が少ない場合は、成熟型 BDNF シグナルの増強は不十分で代償変化は起こらないことを予想した。本研究において、ECS を十分な回数施行した場合、海馬で BDNF/TrkB シグナルが活性化するかどうか及び代償変化が起こるか否かを調べるために、10 日間の ECS による海馬全域、背側海馬、腹側海馬における proBDNF、成熟型 BDNF、full length TrkB、リン酸化 full length TrkB、truncated TrkB の発現変化を調べた。背側海馬は情報処理に、腹側海馬はストレスや

感情に關与する領域とされている<sup>53</sup>。また、ECS の試行回数が少ない場合に代償変化が起きるか否かを調べるために、2 日間の ECS による海馬全域での full length TrkB、truncated TrkB の発現変化を調べた。同時に試行回数の増加に伴う成熟型 BDNF の発現変化を調べるために、2 日間及び 5 日間の ECS による海馬全域での成熟型 BDNF の発現変化を調べた。

### III-2. 方法

#### 動物

7 週齡の雄 Sprague-Dawley rat (クレア社、東京) を、1 ケージにつき 3~4 匹、一定環境 (室温 21℃ ; 湿度 55%~65% ; 明期 08 : 00~20 : 00) 、水及び餌を自由摂取できる環境で飼育した。処置は、the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (<http://grants.nih.gov/grants/olaw/Guide-for-the-Care-and-Use-of-Laboratory-Animals.pdf>) に従った。また防衛医科大学校の動物実験倫理委員会で承認のうえ施行した。

#### ECS プロトコル

実験 1 と同様の方法で行った。偽 ECS 処置を与えた群は両側の耳を ECS 群と同様の時間、通電せずに電極で挟む処置を行った。蛋白の分析のため、最終処置の 4 時間後に脳サンプルの採取を行った。海馬全域、背側海馬、腹側海馬での 10 日間の ECS の影響

をみる実験では、ラットを対照群 (n=7) または ECS 群 (n=7) に割り当てた。海馬全域での 2 日間、5 日間の ECS の影響をみる実験では、ラットを対照群 (n=4)、2 日間 ECS 群 (n=4)、5 日間 ECS 群 (n=4) に割り当てた。

## ウエスタンブロット法

右側の海馬全域を摘出した後、脱リン酸化酵素阻害剤 (PhosSTOP: Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) を含んだ 1×TBS につけた。左側の海馬全域を摘出した後、中央で切断し背側海馬と腹側海馬に分けた後、脱リン酸化酵素阻害剤を含んだ 1×TBS につけた。サンプルを 50 mM Tris、150 mM NaCl、2 mM EDTA、1% Triton X-100、10 µg/ml アプロチニン、1×phosphatase inhibitor 溶液にて溶解した。溶解した細胞を 4°C で 20 分間、15000×g で遠心分離した。上清を回収し、その蛋白含有量を Protein Assay Reagent Kit (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) を使用して測定した。蛋白含有量を等しくした上で、Laemmli sample buffer (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を用いて希釈し、3 分間沸騰した後、氷冷した。サンプルをドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲルを使用して電気泳動した後、セミドライ式の転写装置 (Trans-blot, Bio-Rad laboratories, Inc) を用いて、20 V、30 分間の電圧をかけて転写した。非リン酸化蛋白の検出にはニトロセルロースメンブレン (pore size : 0.2 µm, Thermo Scientific Inc) を、リン酸化蛋白の検出には PVDF メンブレン (pore size : 0.45 µm, GE Health care, Buckinghamshire, UK) を用い

て転写を行った。その後、非リン酸化蛋白に対しては5%スキムミルクを、リン酸化蛋白に対しては5% BSA を用いて、メンブレンのブロッキングを室温1時間で行った。続いて、1次抗体を追加し4℃、一晩、抗原抗体反応を行った。各1次抗体は以下のものを使用した。ウサギ抗BDNF抗体(sc-546、Santa Cruz Biotechnology Inc、1:500希釈)、マウス抗proBDNF抗体(sc-65514、Santa Cruz Biotechnology Inc、1:5000希釈)、ウサギ抗TrkB抗体(#4603、Cell Signaling Technology Inc、1:5000希釈)、ウサギ抗リン酸化TrkB抗体(sc-135645、Santa Cruz Biotechnology Inc、1:1000希釈)。ウサギ抗 $\beta$ アクチン抗体(#5125、Cell Signaling Technology Inc、1:5000希釈)またはウサギ抗GAPDH抗体(#5174、Cell Signaling Technology Inc、1:5000希釈)。上記のウサギ抗TrkB抗体は、full length TrkB (145 kDa)とtruncated TrkB (95 kDa)の2つの蛋白を検出する。その後は実験1と同じ手順で、2次抗体反応を行い、該当バンドを化学発光法にて検出した。成熟型BDNF、proBDNF、full length TrkB、truncated TrkB、リン酸化full length TrkBは感度の高い検出キット(ECL select、GE Healthcare)にて検出し、その他の蛋白はより感度の低い検出キット(ECL prime、GE Healthcare)で検出した。フィルム撮影した写真をスキャナーにて読み取り、ImageJを用いて各バンドを面積×密度により定量した。内部標準物質である $\beta$ アクチンのバンドの面積×濃度に対する成熟型BDNF、proBDNFのバンドの面積×濃度の比を求め標準化した。GAPDHのバンドの面積×密度に対するtruncated TrkB、full length TrkB、リン酸化full length TrkBのバンドの面積×密度の比を求め標準

化した。その後、対照群の標準化した各バンドの定量値の平均値に対する、対照群及び ECS 群の標準化した各バンド定量値の%を算出した。また、ウサギ抗 BDNF 抗体が成熟型 BDNF と反応することを確認するために、BDNF 蛋白 (0.2 µg/ml、R&D Systems、MI、米国) を 2 時間インキュベートした検体と加えない検体の両方でバンドを検出した。

### III-3. 結果

10 日間の ECS が海馬全域、背側海馬、腹側海馬において BDNF/TrkB シグナルに及ぼす影響 (図 6)

#### 成熟型 BDNF に及ぼす影響

BDNF 蛋白を十分に加えた条件下で、ウサギ抗 BDNF 抗体が検出する 14kDa のバンドは完全に消失しており、抗体が成熟型 BDNF と反応していることが示された。海馬全域における成熟型 BDNF 蛋白量は、対照群 (n=7) の  $100 \pm 6\%$  に対し 10 日間 ECS 処置群 (n=7) は  $265 \pm 13\%$  であった。背側海馬における蛋白発現量は、対照群 (n=7) の  $100 \pm 8\%$  に対し 10 日間 ECS 群 (n=7) は  $259 \pm 59\%$  であった。腹側海馬における蛋白発現量は、対照群 (n=7) の  $100 \pm 19\%$  に対し 10 日間 ECS 処置群 (n=7) は  $203 \pm 26\%$  であった。上記 6 群に対して一元配置分散分析を施行し、有意差が検出された ( $F_{5,36}=7.5$ 、 $p<0.001$ )。Tukey post-hoc test で海馬全域、背側海馬、腹側海馬の各領域で、10 日間 ECS 群は対照群よりも有意に増加していた (海馬全域 :  $p<0.01$ 、背側海馬 :  $p<0.05$ 、腹側海馬 :  $p<0.01$ )。これらの結果から、海馬全域、背側海馬、腹側海馬の全ての領域で、10

日間の ECS が成熟型 BDNF 蛋白発現を増加させることが示された。

#### proBDNF に及ぼす影響 (図 7)

海馬全域における proBDNF 蛋白量は、対照群 (n=7) の  $100 \pm 11\%$  に対し 10 日間 ECS 処置群 (n=7) は  $101 \pm 10\%$  であった。背側海馬における蛋白発現量は、対照群 (n=7) の  $100 \pm 8\%$  に対し 10 日間 ECS 処置群 (n=7) は  $98 \pm 8\%$  であった。腹側海馬における蛋白発現量は、対照群 (n=7) の  $100 \pm 10\%$  に対し 10 日間 ECS 処置群 (n=7) は  $100 \pm 9\%$  であった。上記 6 群に対して一元配置分散分析を施行したところ、有意差は検出されなかった ( $F_{5,36}=0.2$ ,  $p>0.05$ )。この結果から、海馬全域、背側海馬、腹側海馬の全ての領域で、10 日間の ECS は proBDNF 蛋白発現に影響を与えないことが示された。

#### truncated TrkB に及ぼす影響 (図 8)

海馬全域における truncated TrkB 蛋白量は、対照群 (n=7) の  $100 \pm 5\%$  に対し、10 日間 ECS 処置群 (n=7) は  $102 \pm 8\%$  であった。背側海馬における蛋白発現量は、対照群 (n=7) の  $100 \pm 6\%$  に対し 10 日間 ECS 処置群 (n=7) は  $102 \pm 10\%$  であった。腹側海馬における蛋白発現量は、対照群 (n=7) の  $100 \pm 12\%$  に対し 10 日間 ECS 処置群 (n=7) は  $90 \pm 7\%$  であった。上記 6 群に対して一元配置分散分析を施行したところ、有意差は検出されなかった ( $F_{5,36}=0.2$ ,  $p>0.05$ )。この結果から、海馬全域、背側海馬、腹側海馬の全ての領域で、10 日間の ECS は truncated TrkB 蛋白発現に影響を与えないことが示され

た。

#### full length TrkB に及ぼす影響 (図 8)

海馬全域における full length TrkB 蛋白量は、対照群 (n=7) において  $100 \pm 5\%$  に対し 10 日間 ECS 処置群 (n=7) は  $67 \pm 3\%$  であった。背側海馬における蛋白発現量は、対照群 (n=7) の  $100 \pm 9\%$  に対し 10 日間 ECS 処置群 (n=7) は  $63 \pm 7\%$  であった。腹側海馬における蛋白発現量は、対照群 (n=7) の  $100 \pm 7\%$  に対し 10 日間 ECS 処置群 (n=7) は  $65 \pm 7\%$  であった。上記 6 群に対して一元配置分散分析を施行し、有意差が検出された ( $F_{5,36}=8.5$ ,  $p<0.001$ )。Tukey post-hoc test で海馬全域、背側海馬、腹側海馬の各領域で、10 日間 ECS 群は対照群よりも有意に減少していた (海馬全域 :  $p<0.05$ 、背側海馬 :  $p<0.01$ 、腹側海馬 :  $p<0.01$ )。これらの結果から、海馬全域、背側海馬、腹側海馬の全ての領域で、10 日間の ECS が full length TrkB 蛋白発現を減少させることが示された。

#### リン酸化 full length TrkB に及ぼす影響 (図 9)

海馬全域におけるリン酸化 full length TrkB 蛋白量は、対照群 (n=7) の  $100 \pm 12\%$  に対し 10 日間 ECS 処置群 (n=7) は  $204 \pm 25\%$  であった。背側海馬における蛋白発現量は、対照群 (n=7) の  $100 \pm 8\%$  に対し 10 日間 ECS 処置群 (n=7) は  $169 \pm 23\%$  であった。腹側海馬における蛋白発現量は、対照群 (n=7) の  $100 \pm 6\%$  に対し 10 日間 ECS 処置群 (n=7) は

217±15%であった。上記 6 群に対して一元配置分散分析を施行し、有意差が検出された ( $F_{5,36}=8.1$ ,  $p<0.001$ )。Tukey post-hoc test で海馬全域、背側海馬、腹側海馬の各領域で、10 日間 ECS 群は対照群よりも有意に増加していた (海馬全域 :  $p<0.01$ 、背側海馬 :  $p<0.05$ 、腹側海馬 :  $p<0.01$ )。これらの結果から、海馬全域、背側海馬、腹側海馬の全ての領域で、10 日間の ECS がリン酸化 full length TrkB 蛋白発現を増加させることが示された。

## 2 日間、5 日間の ECS による海馬全域における成熟型 BDNF の発現変化 (図 10)

対照群、2 日間 ECS 群、5 日間 ECS 群、の海馬全域における成熟型 BDNF 発現量は、対照群 (n=4) の 100±15%に対し、2 日間 ECS 処置群 (n=4) は 197±13%、5 日間 ECS 群 (n=4) は 264±37%、であった。一元配置分散分析で有意差が検出された ( $F_{2,9}=6.6$ ,  $p<0.05$ )。Tukey post-hoc test で 5 日間 ECS 群は対照群と比較して、有意に増加していた ( $p<0.05$ )。これらの結果から、ECS の施行回数を重ねるにつれて、海馬全域で成熟型 BDNF が段階的に増加することが示された。

## 2 日間の ECS による海馬全域における TrkB の発現変化 (図 11)

対照群、2 日間 ECS 群、の海馬全域における truncated TrkB 発現量は、対照群 (n=4) の 100±6%に対し、2 日間 ECS 処置群 (n=4) は 96±4%、であった。Student の t 検定で 2 群間に有意差は検出されなかった ( $t_6=0.5$ )。full length TrkB 発現量は、対照群



(n=4) の  $100 \pm 14\%$  に対し、2 日間 ECS 処置群 (n=4) は  $101 \pm 13\%$ 、であった。Student の t 検定で 2 群間に有意差は検出されなかった ( $t_6=0.2$ )。これらの結果から、ECS の試行回数が少ない場合、truncated TrkB、full length TrkB の蛋白発現は変化しないことが示された。

### III-4. 考察

本研究において、ECS による BDNF とその前駆体、受容体である 2 種類のサブタイプの TrkB 及びその活性化型の蛋白発現への ECS の影響を示した。

海馬全域において、成熟型 BDNF は電気けいれん刺激を重ねるにつれて段階的に発現が増加した。試行回数を重ねるにつれて ECT が治療効果を発揮することと、時間経過が同様であり、このことは成熟型 BDNF の発現増加が ECT の治療機序に関与していることを示唆する。特に腹側海馬はストレス反応や感情に関与する領域であり<sup>51</sup>、この領域での成熟型 BDNF の発現増加は治療効果に強く関係していると考えられる。

10 日間の電気けいれん刺激により、海馬全域、背側海馬、腹側海馬の各領域で、成熟型 BDNF が増加する一方 proBDNF の発現量は不変であった。成熟型 BDNF とは違い proBDNF は受容体である p75NTR に結合し、神経活動を抑制すると共に、アポトーシスを誘導することが知られている<sup>27,28</sup>。けいれん重積の動物モデルでは、proBDNF から成熟型 BDNF への変換が抑制されることが報告されている<sup>54</sup>。本研究の結果は、けいれん重積の報告とは異なり、ECT では proBDNF から成熟型 BDNF への変換が増強している可

能性を示している。けいれん重積と ECT では、けいれんの持続時間が大きく異なり、けいれん重積の動物モデルでは、けいれんの持続時間は数時間であるが、ECS は約 20 秒である。複数回の ECS では細胞死を起こすことなく海馬神経樹状突起が伸長することが報告されている<sup>55</sup> が、けいれん重積動物モデルは広範囲に渡って細胞死を伴う<sup>54</sup>。proBDNF の発現量の違いが、けいれん重積と ECT の中枢神経に与える影響の違いに関与している可能性がある。

10 日間の ECS により、海馬全域、背側海馬、腹側海馬の各領域で、リン酸化 full length TrkB の発現が増加した。このことは、BDNF/TrkB シグナルが ECT で活性化することを裏付ける。それに対して、リン酸化されていない full length TrkB の発現量は減少し、truncated TrkB は不変であった。2 日間の ECS では full length TrkB の発現に変化がないことから、リガンドである成熟型 BDNF の段階的な上昇に反応して full length TrkB が減少しており、実験 1 で示した 10 日間の ECS による受容体のエンドサイトーシスと RAB7 を介してライソソームに運ばれ分解される経路の活性化が full length TrkB の減少に関与している可能性がある。先行研究では、BDNF を 2 週間持続的に海馬内へ投与することで、リン酸化 full length TrkB が減少することが報告されている<sup>51</sup>が、本研究では成熟型 BDNF の持続的上昇にも関わらず、リン酸化 full length TrkB 発現は増加した。このことは 10 日間の ECS では、成熟型 BDNF の発現上昇以外の機序が作用してリン酸化 full length TrkB 発現を上昇させる可能性を示唆している。

full length TrkB は海馬の軸索、細胞体、樹状突起スパイン、樹状突起分枝に幅広く局在していることが知られている<sup>56</sup>。海馬神経培養細胞を用いた研究で、BDNF を加えることにより樹状突起に TrkB を輸送する RAB11 陽性エンドソームが蓄積すること、Rab11 のドミナントネガティブ突然変異体が BDNF 付加による樹状突起分枝増加を阻害すること、更には RAB11 を持続的に活性化させる処置は、TrkB を輸送する RAB11 陽性エンドソームの樹状突起上での蓄積と樹状突起分枝を増加させることが報告されている<sup>57</sup>。また、化学的にシナプス伝達の長期増強 (long term potentiation) を誘発する処置によって、BDNF/TrkB シグナルが増強するが、その際に RAB11 陽性エンドソームを介して full length TrkB がシナプス後膜に輸送されること、RNA 干渉により Rab11 遺伝子発現を抑制することで full length TrkB の輸送を阻害した場合には、BDNF/TrkB シグナルが抑制されることが報告されている<sup>58</sup>。これらの先行研究は、ECS による BDNF/TrkB シグナルの活性化において、RAB11 を介した recycling pathway の重要性を示すものである。本研究の結果から、ECT により成熟型 BDNF/リン酸 TrkB 複合体が、エンドサイトーシスの後に RAB11 を介した小胞輸送によって樹状突起やシナプス後膜へ輸送されることで、海馬の構造変化が促進される可能性がある。

#### IV. 結論

実験 1 および 2 より、ECT が海馬で小胞輸送機構を広範囲に活性化すると同時に、full length TrkB の減少を伴いながら BDNF/TrkB シグナルを増強させ、それらがてんか

ん活動性上昇の回避と、抗うつ効果に関与している可能性が示唆された。すなわち、エンドサイトーシスと RAB7 を介した degrading pathway が、細胞膜表面の full length TrkB 受容体数を制御して BDNF/TrkB シグナルを適切に調節し、RAB11 を介した recycling pathway が、リン酸化 full length TrkB の樹状突起やシナプス後膜における局在を増加させることが治療効果につながる、という可能性である。

## 謝辞

稿を終えるにあたり、本研究において多大なる御指導と御鞭撻を賜りました防衛医科大学校精神科学講座 吉野相英教授、多大なる御支援を頂いた行動科学研究部門 清水邦夫教授に謝意を申し上げます。本研究にあたり、日夜を問わず実験及び論文の御指導、御協力を賜りました元精神科学講座講師（現東北医科薬科大学精神科学講座講師）丹生谷正史先生に深く謝意を申し上げます。さらに御支援頂きました精神科学講座、行動科学講座、動物実験施設、共同利用研究施設の皆様に感謝申し上げます。また技術的、秘書的業務の御支援を頂いた精神科学講座 広瀬裕子女史に感謝申し上げます。

## 単語・略語説明

AMPA :  $\alpha$ -3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid

BDNF : Brain-derived neurotrophic factor

BSA : Bovine serum albumin (ウシ血清アルブミン)

ECS : Electroconvulsive shock (電気けいれん処置)

ECT : Electroconvulsive therapy (電気けいれん療法)

EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid (エチレンジアミン四酢酸)

GAPDH : Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (グリセルアルデヒド-3-リン酸デ  
ヒドロゲナーゼ)

MES : 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (2-モルホリノエタンスルホン酸)

NGF : Nerve growth factor

PBS : Phosphate buffered saline

PVDF : Polyvinylidene difluoride (ポリフッ化ビニリデン)

P75NTR : p75 neurotrophin receptor

TBS : Tris buffered saline

TrkB : tropomyosin receptor kinaseB

## 引用文献

1. Schildkraut JJ : The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *American Journal of Neuroscience* 122 : 509-522, 1965
2. Sulser F : Giovanni Lorenzini Foundation Lecture. Antidepressant drug research: its impact on neurobiology and psychobiology. *Advances in biochemical psychopharmacology* 31 : 1-20, 1982
3. Watanabe Y, Gould E, McEwen BS : Stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3 pyramidal neurons. *Brain Research* 588 : 341-345, 1992
4. McEwen BS : Stress and hippocampal plasticity. *Annual Review of Neuroscience* 22 : 105-122, 1999
5. Campbell S, Macqueen G : Lower hippocampal volume in patients suffering from depression : a meta-analysis. *The American Journal of Psychiatry* 61 : 598-607, 2004.
6. Videbech P, Ravnkilde B : Hippocampal volume and depression : a meta-analysis of MRI studies. *The American Journal of psychiatry* 161 : 1957-1966, 2004.
7. Sheline YI, Wang PW, Gado MH, Csernansky JG, Vannier MW : Hippocampal atrophy in recurrent major depression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America* 93 : 3908-3913, 1996

8. Sheline YI, Sanghavi M, Mintun MA, Gado MH. : Depression duration but not age predicts hippocampal volume loss in medically healthy women with recurrent major depression. *The Journal of Neuroscience* 19 : 5034–5043, 1999
9. Duman RS, Malberg J, Thome J : Neural plasticity to stress and antidepressant treatment. *Biological Psychiatry* 46 : 1181–1191, 1999
10. UK ECT Review Group : Efficacy and safety of electroconvulsive therapy in depressive disorders, a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 361 : 799–808, 2003
11. Kellner CH, Greenberg RM, Murrrough JW, Bryson EO, Briggs MC, Pasculli RM : ECT in treatment-resistant depression. *The American Journal of Psychiatry* 169 : 1238–1244, 2012
12. Abbott CC, Jones T, Lemke NT, Gallegos P, McClintock SM, Mayer AR, et al : Hippocampal structural and functional changes associated with electroconvulsive therapy response. *Translational Psychiatry* 124 : 4:e483, 2014
13. Madsen TM, Treschow A, Bengzon J, Bolwig TG, Lindvall O, Tingström A : Increased neurogenesis in a model of electroconvulsive therapy. *Biological Psychiatry* 47 : 1043–1049, 2000
14. Okada-Tsuchioka M, Segawa M, Kajitani N, Hisaoka-Nakashima K, Shibasaki C,

- Morinobu S, et al : Electroconvulsive seizure induces thrombospondin-1 in the adult rat hippocampus. *Progress in Neuro-psychopharmacology and Biological Psychiatry* 48 : 236-244, 2014
15. Smitha J.S, Roopa R, Khaleel N, Kutty BM, Andrade C : Images in electroconvulsive therapy, electroconvulsive shocks dose-dependently increase dendritic arborization in the CA1 region of the rat hippocampus. *Journal of ECT* 30 : 191-192, 2014
16. Bergstrom DA, Kellar KJ : Effect of electroconvulsive shock on monoaminergic receptor binding sites in rat brain. *Nature* 278 : 464-466, 1979
17. Winkle CC, Gupton SL : Membrane Trafficking in Neuronal Development: Ins and Outs of Neural Connectivity. *International Review of Cell and Molecular Biology* 322 : 247-280, 2016
18. Nibuya M., Morinobu S, Duman RS : Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. *The Journal of Neuroscience* 15 : 7539-7547, 1995
19. Suzuki G, Kanda Y, Nibuya M, Hiramoto T, Tanaka T, Shimizu K, et al : Stress and electroconvulsive seizure differentially alter GPR56 expression in the adult rat brain. *Brain research* : 21-31, 2007



20. Li B, Suemaru K, Cui R, Araki H, et al : Repeated electroconvulsive stimuli have long-lasting effects on hippocampal BDNF and decrease immobility time in the rat forced swim test. *Life Sciences* 80 : 1539-1543, 2007
21. Squinto SP : TrkB encodes a functional receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 but not nerve growth factor. *Cell* 65 : 885-893, 1991
22. Le Roy C, Wrana JL : Clathrin- and non-clathrin-mediated endocytic regulation of cell signaling. *Nature Review Molecular Cell Biology* 6 : 112-126, 2005
23. Otto GP, Nichols BJ : The roles of flotillin microdomains-endocytosis and beyond. *Journal of Cell Science* 124 : 3933-3940, 2011
24. Ng EL, Tang BL : Rab GTPases and their roles in brain neurons and glia. *Brain Research Review* 58 : 236-246, 2008
25. Acheson A, Conover JC, Fandl JP, DeChiara TM, Russell M, Thadani A, et al : A BDNF autocrine loop in adult sensory neurons prevents cell death. *Nature* 374 : 450-453, 1995
26. Huang EJ, Reichardt LF : Neurotrophins: Roles in Neuronal Development and Function. *Annual Review of Neuroscience* 24 : 677-736, 2001
27. Woo NH, Teng HK, Siao CJ, Chiaruttini C, Pang PT, Milner TA, et al :

- Activation of p75NTR by proBDNF facilitates hippocampal long-term depression. *Nature Neuroscience* 8 : 1069-1077, 2005
28. Teng HK, Teng KK, Lee R, Wright S, Tevar S, Almeida RD, et al : ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *The Journal of Neuroscience* 25 : 5455-5463, 2005
29. Klein R, Conway D, Parada LF, Barbacid M : The trkB tyrosine protein kinase gene codes for a second neurogenic receptor that lacks the catalytic kinase domain. *Cell* 61 : 647-656, 1990
30. Ohira K, Kumanogoh H, Sahara Y, Homma KJ, Hirai H, Nakamura S, et al : A truncated tropomyosin-related kinase B receptor, T1, regulates glial cell morphology via Rho GDP dissociation inhibitor 1. *The Journal of Neuroscience* 25, 1343-1353, 2005
31. Rose CR, Blum R, Pichler B, Lepier A, Kafitz KW, Konnerth A : Truncated TrkB-T1 mediates neurotrophin-evoked calcium signalling in glia cells. *Nature* 426 : 74-78, 2003
32. Shirane M, Nakayama KI, : Protrudin induces neurite formation by directional membrane Trafficking. *Science* 314 : 818-821, 2006
33. Schuck S, Honsho M, Ekroos K, Shevchenko A, Simons K : Resistance of cell membranes to different detergents. *Proceedings of the National Academy of*

- Sciences. USA. 100 : 5795–5800, 2003
34. Otabe H, Nibuya M, Shimazaki K, Toda H, Suzuki G, Nomura S, et al :  
Electroconvulsive seizures enhance autophagy signaling in rat hippocampus.  
Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry 50 : 37–43,  
2014
35. 本橋伸高, 栗田主一, 一瀬邦弘, 上田諭, 大久保善郎, 奥村正紀, 他 :  
電気けいれん療法(ECT)推奨事項 改訂版. 精神神経科学雑誌 115 : 586–600, 2013
36. Li P1, Hao XC1, Luo J1, Lv F1, Wei K1, Min S1 : Propofol Mitigates Learning  
and Memory Impairment After Electroconvulsive Shock in Depressed Rats by  
Inhibiting Autophagy in the Hippocampus. Medical Science Monitor 22 : 1702–  
1708, 2016
37. Newpher TM, Idrissi FZ, Geli MI, Lemmon SK : Novel function of clathrin  
light chain in promoting endocytic vesicle formation. Molecular Biology of  
the Cell 17 : 4343–4352, 2006
38. Huganir RL, Nicoll RA : AMPARs and synaptic plasticity: the last 25 years.  
Neuron 80 : 704–717, 2013
39. Hoogenraad CC, van der Sluijs P : GRASP-1 regulates endocytic receptor  
recycling and synaptic plasticity. Communicative and integrative biology  
3 : 433–435, 2010

40. Li W, Liu L, Liu YY, Luo J, Lin JY, Li X, et al : Effects of electroconvulsive stimulation on long-term potentiation and synaptophysin in the hippocampus of rats with depressive behavior. *Journal of ECT* 28 : 111-117, 2012
41. Hosoda K, Duman RS : Regulation of beta 1-adrenergic receptor mRNA and ligand binding by antidepressant treatments and norepinephrine depletion in rat frontal cortex. *Journal of Neurochemistry* 60 : 1335-1343, 1993
42. 井上猛, 北市雄士, 小山司 : 治療抵抗性うつ病の治療戦略とその作用機序. *精神神経科学雑誌* 106 : 1016-1024, 2004
43. Saxena S, Howe CL, Cosgaya JM, Hu M, Weis J, Krüttgen A : Differences in the surface binding and endocytosis of neurotrophins by p75NTR. *Molecular and Cellular Neuroscience* 26 : 292-307, 2004
44. Saxena S, Bucci C, Weis J, Kruttgen A : The small GTPase Rab7 controls the endosomal trafficking and neuritogenic signaling of the nerve growth factor receptor TrkA. *The Journal of Neuroscience* 25 : 10930-10940, 2005
45. Conti G, Gale K, Kondratyev A : Immunohistochemical evaluation of the protein expression of nerve growth factor and its TrkA receptor in rat limbic regions following electroshock seizures. *Neuroscience Research* 65 : 201-209, 2009

46. Molendijk ML, Spinhoven P, Polak M, Bus BA, Penninx BW, Elzinga BM : Serum BDNF concentrations as peripheral manifestations of depression : evidence from a systematic review and meta -analyses on 179 associations (N = 9484). *Molecular Psychiatry* 19 : 791-800, 2014
47. Zhang JC, Yao W, Dong C, Yang C, Ren Q, Ma M, et al : Comparison of ketamine, 7,8-dihydroxyflavone, and ANA-12 antidepressant effects in the social defeat stress model of depression. *Psychopharmacology* 232 : 4325-4335, 2015
48. de Almeida JF, Chen P, Henry MA, Diogenes A : Stem cells of the apical papilla regulate trigeminal neurite outgrowth and targeting through a BDNF-dependent mechanism. *Tissue Engineering Part A* 20 : 3089-3100, 2014
49. Li Z, Sun C, Zhang T, Mo J, Shi Q, Zhang X, et al : Geranylgeranyltransferase I mediates BDNF-induced synaptogenesis. *Journal of Neurochemistry* 125 : 698-712, 2013
50. Croll SD, Suri C, Compton DL, Simmons MV, Yancopoulos GD, Lindsay RM, et al : Brain-derived neurotrophic factor transgenic mice exhibit passive avoidance deficits, increased seizure severity and in vitro hyperexcitability in the hippocampus and entorhinal cortex. *Neuroscience* 93 : 1491-1506, 1999

51. Xu B, Michalski B, Racine RJ, Fahnstock M : The effects of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) administration on kindling induction, Trk expression and seizure-related morphological changes. *Neuroscience* 126 : 521-531, 2004
52. Nibuya M, Takahashi M, Russell DS, Duman RS : Repeated stress increases catalytic TrkB mRNA in rat hippocampus. *Neuroscience Letters* 267 : 81-84, 1999
53. Fanselow MS, Dong HW : Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron* 65 : 7-19, 2010
54. Thomas AX, Cruz Del Angel Y, Gonzalez MI, Carrel AJ, Carlsen J, Lam PM, et al : Rapid increases in proBDNF after pilocarpine-induced status epilepticus in mice are associated with reduced proBDNF cleavage machinery. *eNeuro* 3(1), 2016
55. Vaidya VA, Siuciak JA, Du F, Duman RS : Hippocampal mossy fiber sprouting induced by chronic electroconvulsive seizures. *Neuroscience* 89 : 157-166, 1999
56. Drake CT, Milner TA, Patterson SL : Ultrastructural localization of full-length trkB immunoreactivity in rat hippocampus suggests multiple roles in modulating activity-dependent synaptic plasticity. *The Journal of*

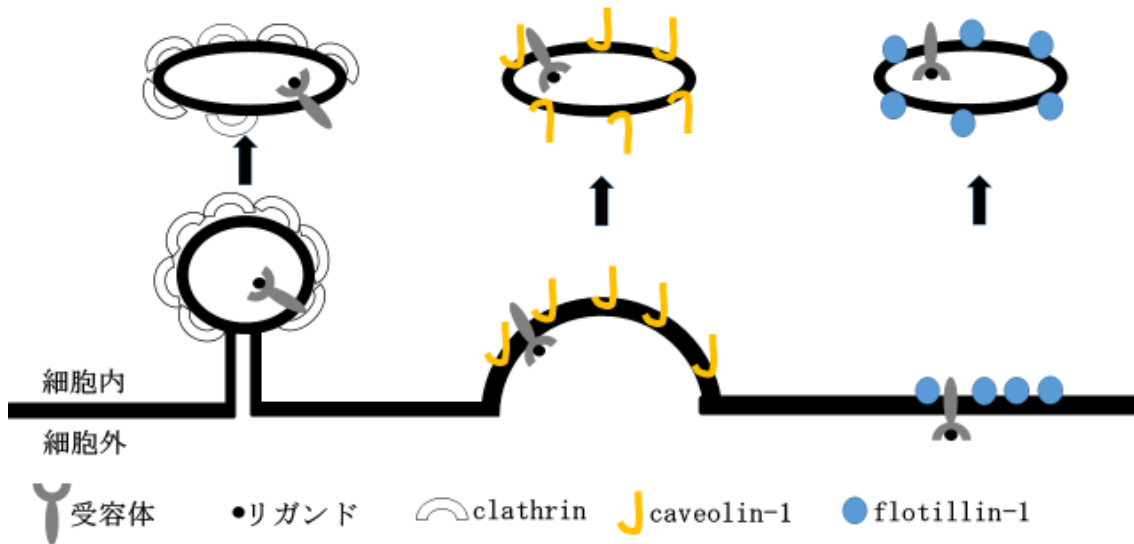
Neuroscience 19 : 8009–8026, 1999

57. Lazo OM, Gonzalez A, Ascaño M, Kuruvilla R, Couve A, Bronfman FC : BDNF regulates Rab11-mediated recycling endosome dynamics to induce dendritic branching. *The Journal of Neuroscience* 33 : 6112–6122, 2013
58. Huang SH, Wang J, Sui WH, Chen B, Zhang XY, Yan J, et al : BDNF-dependent recycling facilitates TrkB translocation to postsynaptic density during LTP via a Rab11-dependent pathway. *The Journal of Neuroscience* 33 : 9214–9230, 2013

図 1

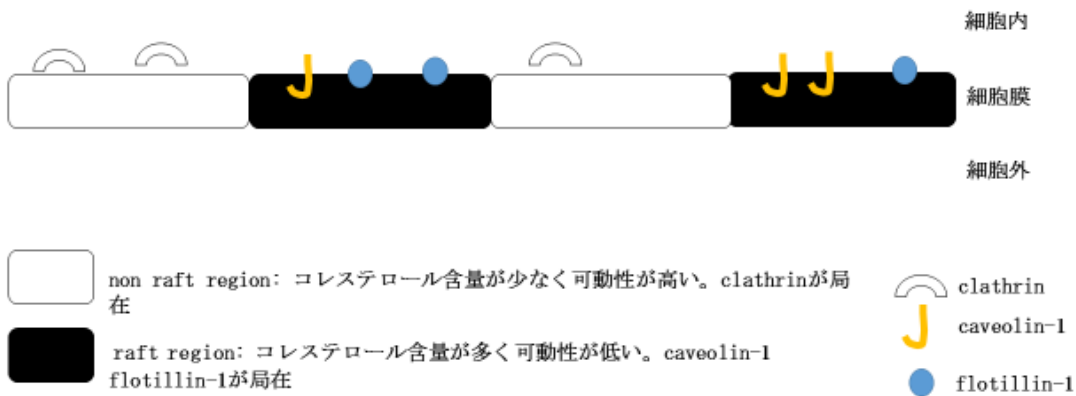
A)

エンドサイトーシス関連蛋白 (clathrin, caveolin-1, flotillin-1)



B)

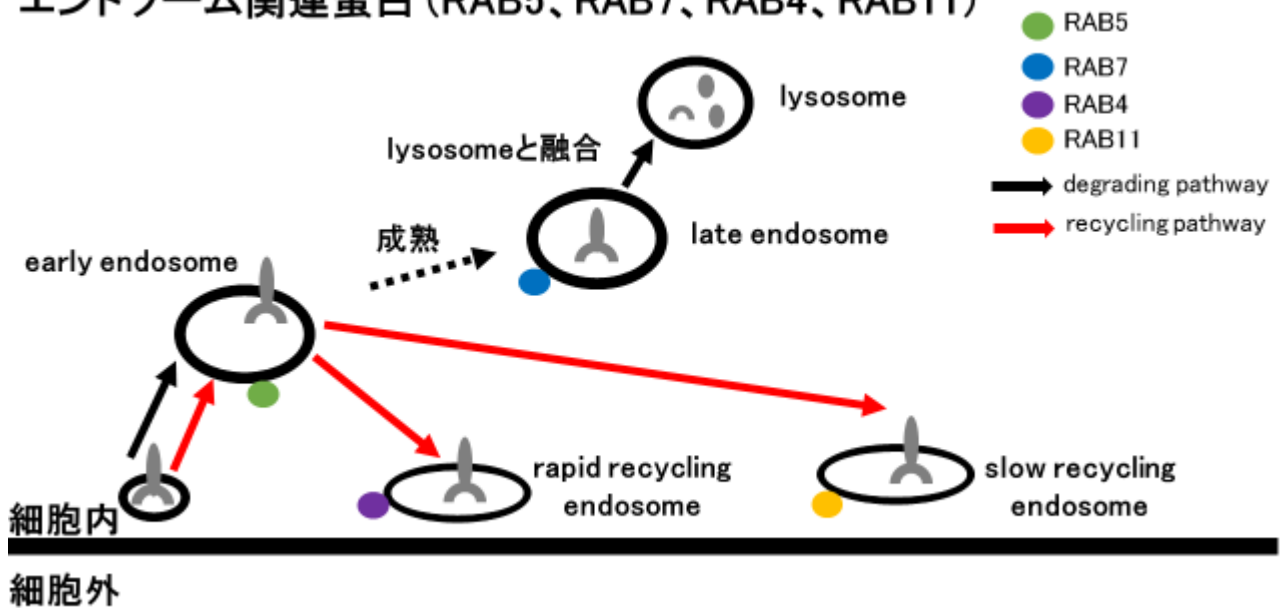
エンドサイトーシス関連蛋白の細胞膜上での局在











c)

### エンドソーム関連蛋白 (RAB5、RAB7、RAB4、RAB11)



### 図1の説明

- A) エンドサイトーシス関連蛋白の説明。黒線は細胞膜を示している。エンドサイトーシスされるリガンドと受容体はそれぞれ ●、Y で示している。clathrin はエンドサイトーシスの際に細胞膜が窪んで形成される小胞を裏打ちする蛋白で、 で示している。caveolin-1、flotillin-1 は細胞膜に凹みを形成する蛋白であり、それぞれ 、 で示している。
- B) エンドサイトーシス関連蛋白の細胞膜上での局在。細胞膜上で、脂質ラフト以外の領域は白色の領域で、脂質ラフト領域は黒色で示している。clathrin、caveolin-1、flotillin-1 はそれぞれ A) と同様に 、、 で示している。脂質ラフト以外の領域には clathrin が局在し、脂質ラフト領域には caveolin-1、flotillin-1 がそれぞれ局在している。
- C) エンドソーム関連蛋白の説明。細胞膜は黒線で、細胞質内のエンドソームは黒線で囲ま


れた楕円形～円形の構造物として示している。エンドソーム内に取り込まれて細胞質内を運ばれる受容体は、 で示している。細胞内に取り込まれた物質は、まず細胞辺縁部に存在する early endosome へと小胞輸送される。early endosome を起点として、細胞膜で再利用される場合は recycling pathway に、lysosome で分解される場合は degrading pathway に振り分けられる。recycling pathway には rapid recycling endosome に小胞輸送された後に細胞膜に素早く戻る経路、slow recycling endosome を経由して細胞膜に時間をかけて戻る経路がある。late endosome は early endosome が成熟したオルガネラであり、lysosome と融合して内容物を分解に導く。early endosome に RAB5 が、rapid recycling endosome に RAB4 が、slow recycling endosome に RAB11 が、late endosome に RAB7 が、局在して小胞輸送に関わる。

図 2

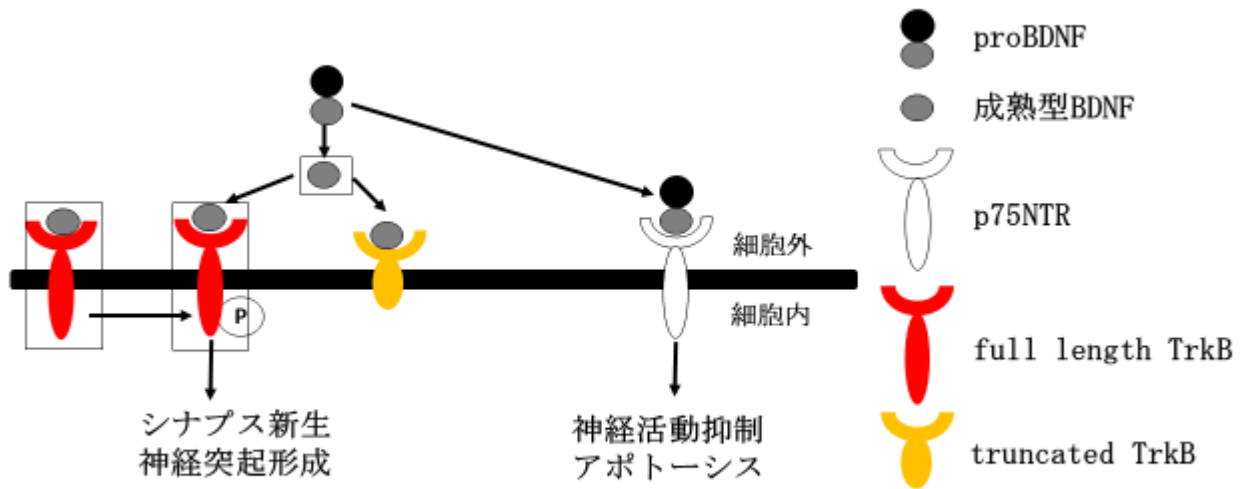
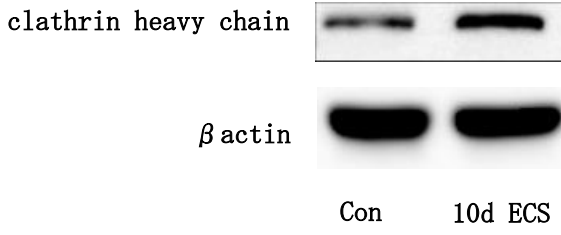


図 2 の説明

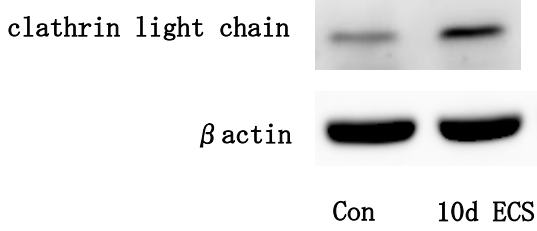
図 2. BDNF/TrkB シグナルの流れ。黒線は細胞膜を示している。●、●はそれぞれ成熟型 BDNF，前駆体である proBDNF を示している。☪、☪、☪は、それぞれ p75NTR、full length TrkB、truncated TrkB を示している。proBDNF は p75NTR と結合することで神経細胞活動抑制、アポトーシスなどの作用を発揮する。成熟型 BDNF は 119 個のアミノ酸からなるポリペプチド(分子量 14,000)で、ニューロトロフィンファミリーに属する神経栄養因子である。成熟型 BDNF が full length TrkB と結合すると受容体が自己リン酸化されシナプス新生、神経突起形成などの作用を発揮する。

图 3

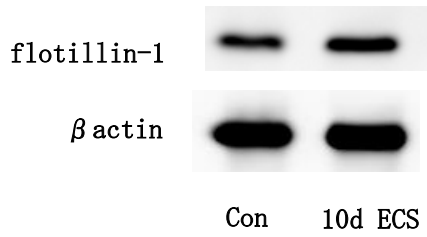
A)



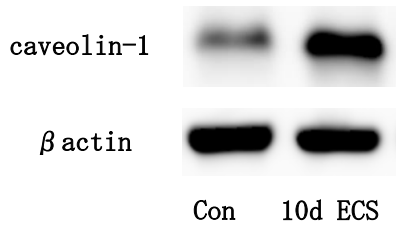
B)



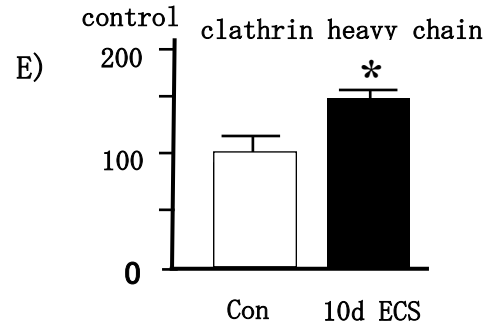
C)



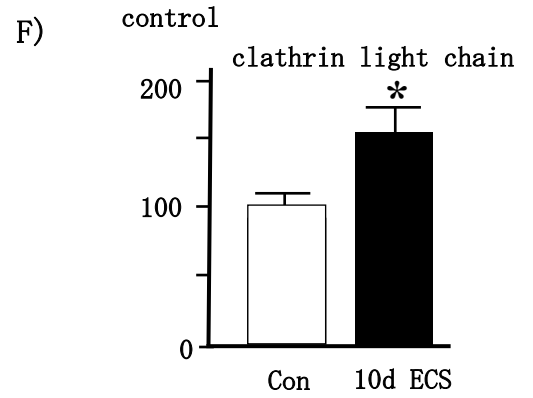
D)



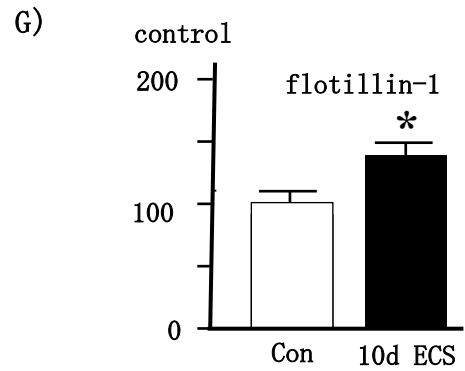
% of mean



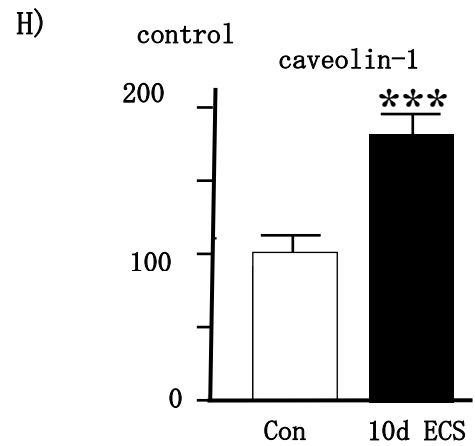
% of mean



% of mean



% of mean



### 図 3 の説明

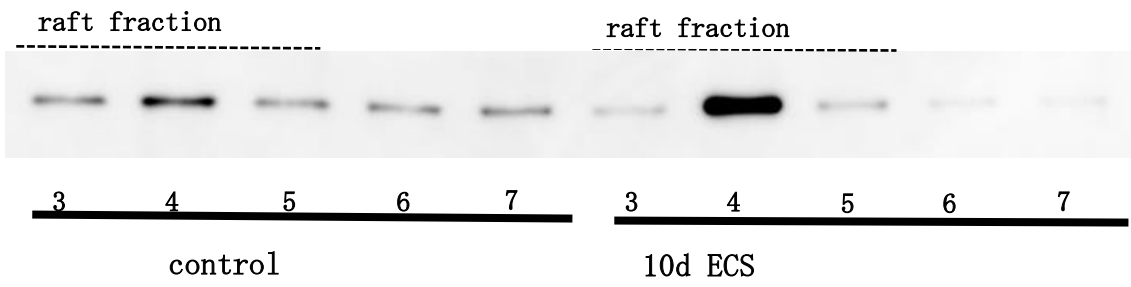
海馬全域のエンドサイトーシス関連蛋白発現のウエスタンブロット法による分析

A, B, C, D) clathrin heavy chain (A)、clathrin light chain (B)、flotillin-1 (C)、caveolin-1 (D) 蛋白発現について、ウエスタンブロット法で検出されたバンドの 1 例を提示している。

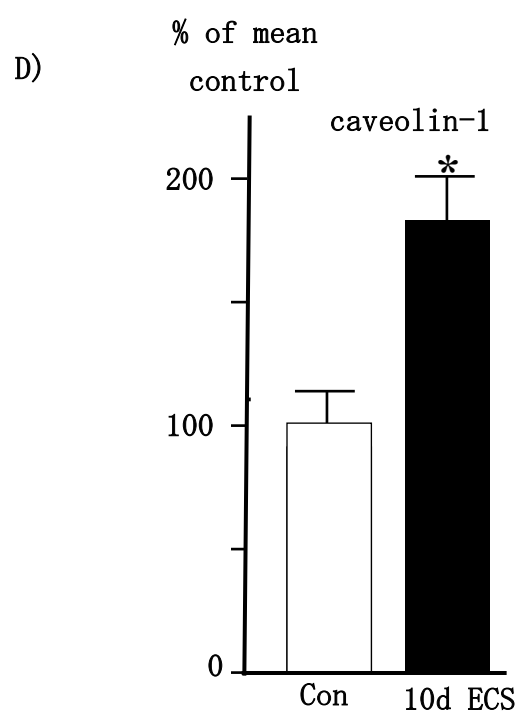
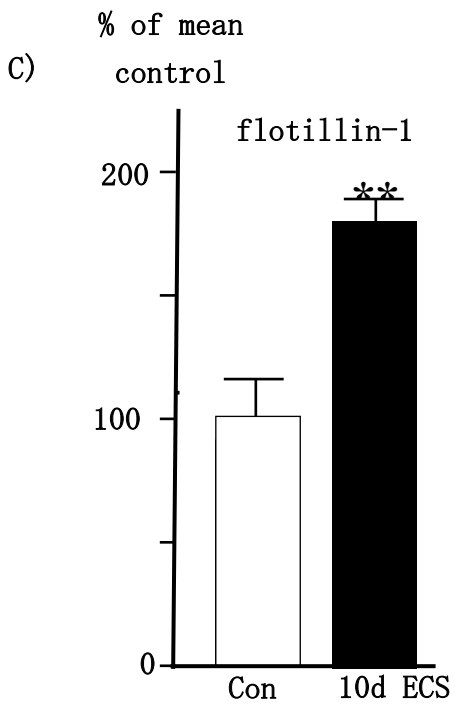
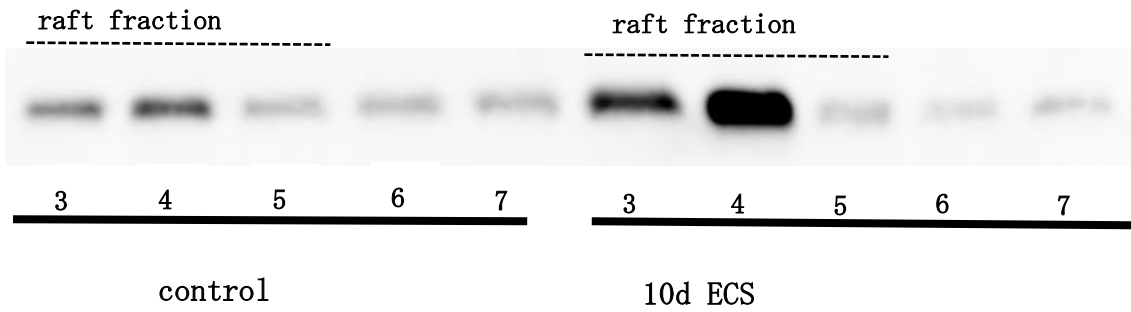
E, F, G, H) 対照群 (Con) と 10 日間電気けいれん刺激群 (10d ECS) の蛋白発現を、各群 7 匹のラットで比較した結果、10 日間電気けいれん刺激群 の clathrin heavy chain (E)、clathrin light chain (F)、flotillin-1(G)、caveolin-1 (H) 蛋白発現は有意に増加した。\*  $p < 0.05$ 、。\*\*\*  $p < 0.001$

图 4

A) flotillin-1



B) caveolin-1



#### 図 4 の説明

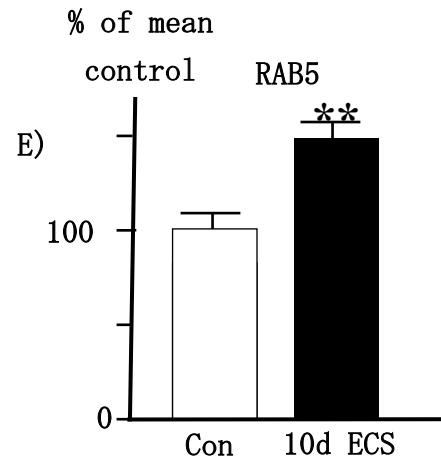
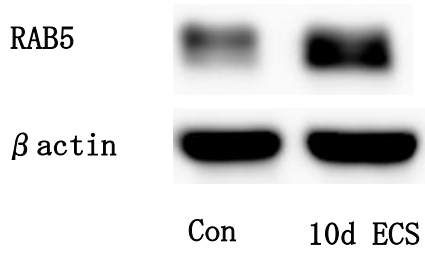
海馬全域における脂質ラフト分画のラフト関連蛋白発現のウエスタンブロット法による分析

A, B) flotillin-1(A)、caveolin-1 (B) 蛋白発現について、ウエスタンブロット法で検出されたバンドの 1 例を提示している。バンドの下に記載された数値はショ糖密度勾配遠心法により分離された 12 の分画を示しており、数値が小さいほど低密度の分画である。flotillin-1、caveolin-1 は主に低密度順で 3-5 番目の分画に検出された。

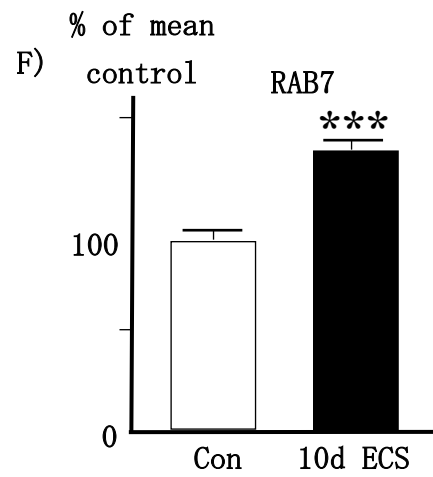
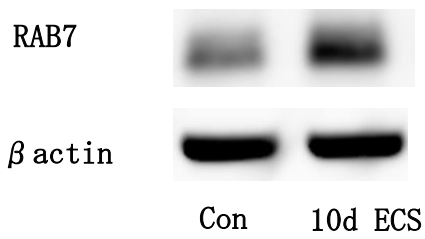
C, D) 対照群 (Con) と 10 日間電気けいれん刺激群 (10d ECS) の海馬脂質ラフト分画での蛋白発現を、各群 7 匹のラットで比較した結果、10 日間電気けいれん刺激群の flotillin-1 (C)、caveolin-1 (D) 蛋白発現は有意に増加した。\* $p < 0.05$ 、\*\* $p < 0.01$

图 5

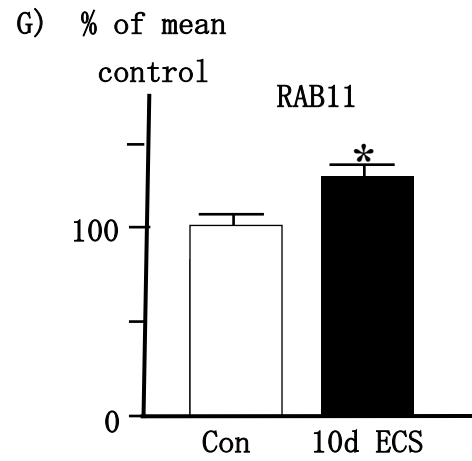
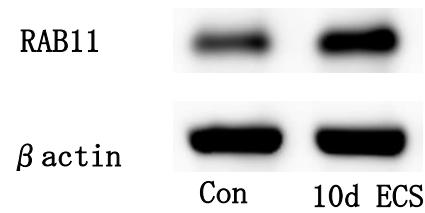
A)



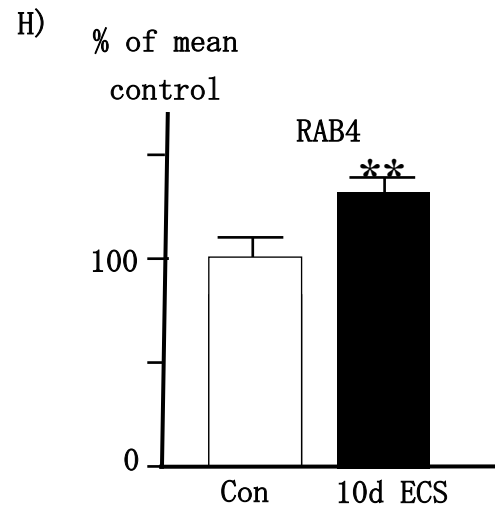
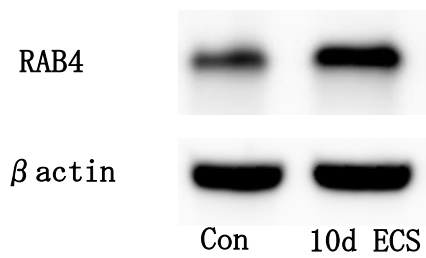
B)



C)



D)





## 図 5 の説明

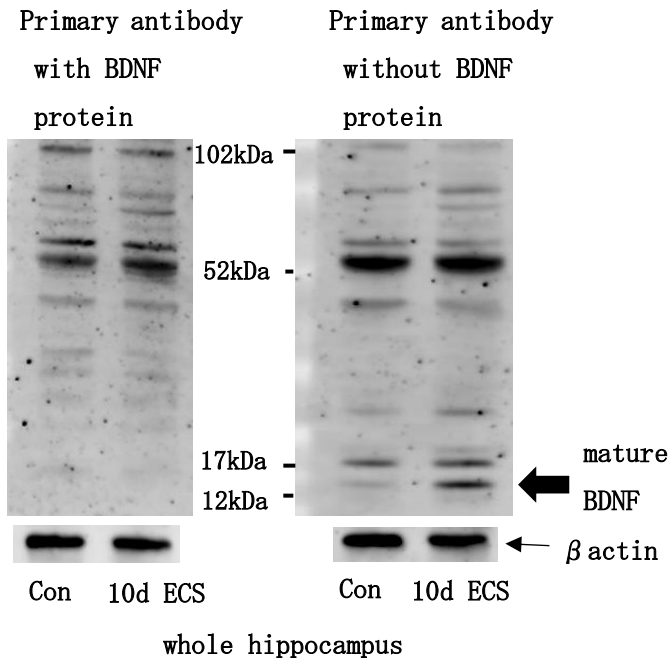
海馬全域のエンドソーム関連蛋白発現のウエスタンプロット法による分析

A, B, C, D) RAB5 (A)、RAB7 (B)、RAB11 (C)、RAB4 (D) 蛋白発現について、ウエスタンプロット法で検出されたバンドの 1 例を提示している。

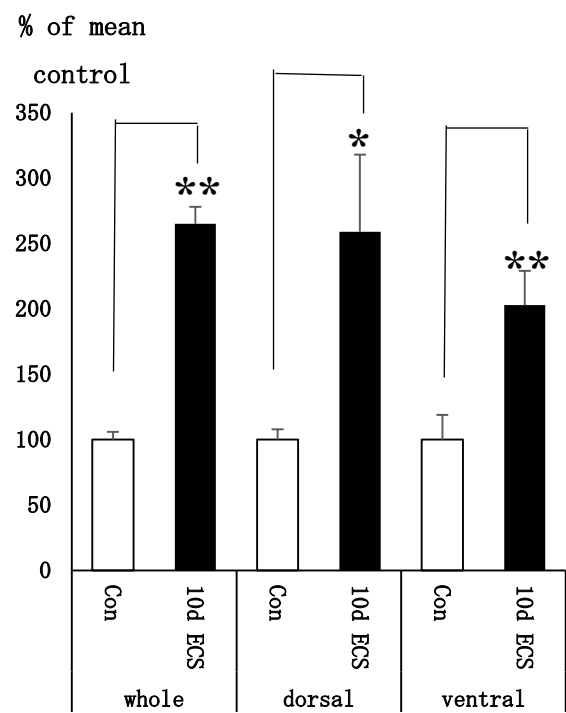
E, F, G, H) 対照群 (Con) と 10 日間電気けいれん刺激群 (10d ECS) の蛋白発現を、各群 7 匹のラットで比較した結果、10 日間電気けいれん刺激群の RAB5 (E)、RAB7 (F)、RAB11 (G)、RAB4 (H) 蛋白発現は有意に増加した。 $* p < 0.05$ 、 $** p < 0.01$ 、 $*** p < 0.001$

图 6

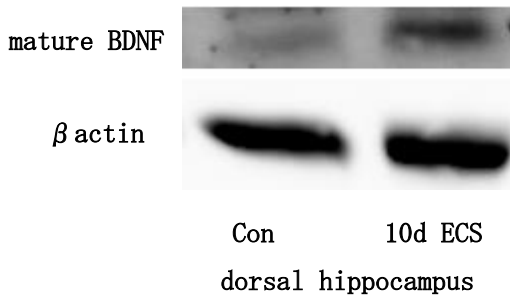
A)



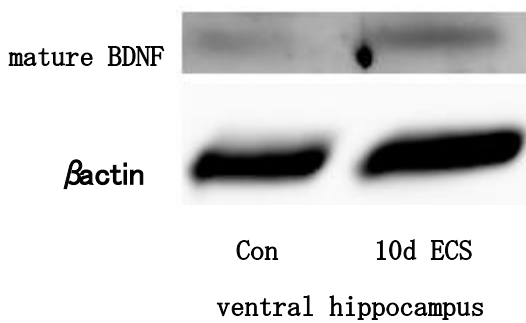
D)



B)



C)



## 図 6 の説明

10 日間 ECS による海馬全域・背側海馬・腹側海馬の成熟型 BDNF 蛋白発現のウエスタンブロット法による分析

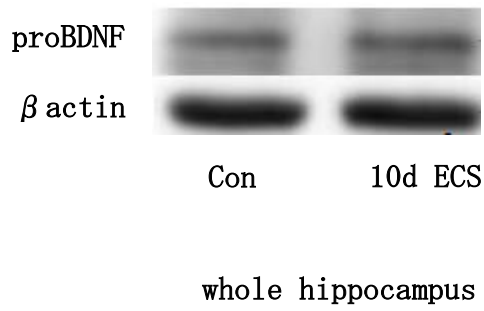
A) 抗体溶液に BDNF 蛋白を十分に加えた条件下及び加えない条件下で、10 日間の ECS による海馬全域での成熟型 BDNF 蛋白発現変化について、ウエスタンブロット法で検出されたバンドを提示している。BDNF を加えた条件下では、成熟型 BDNF (14 kDa) のバンドは検出されていない。

B, C) 10 日間の ECS による背側海馬 (B)、腹側海馬 (C)、での成熟型 BDNF 蛋白発現変化について、ウエスタンブロット法で検出されたバンドの 1 例を提示している。

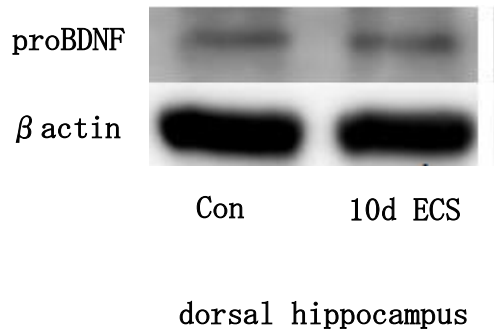
D) 海馬全域、背側海馬、腹側海馬の各領域における対照群 (Con) と、10 日間の電気けいれん刺激群 (10d ECS) の成熟型 BDNF 蛋白発現を、各群 7 匹のラットで比較した結果、全ての領域で、10 日間の電気けいれん刺激群の蛋白発現は有意に増加した。\*  $p < 0.05$ 、\*\*  $p < 0.01$

图 7

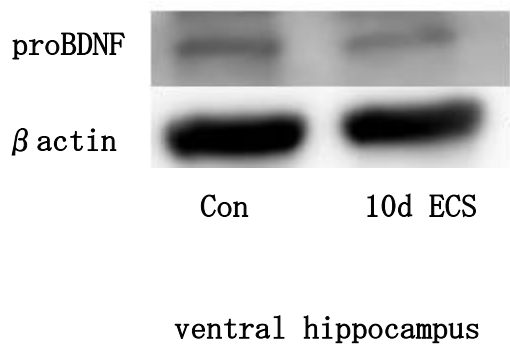
A)



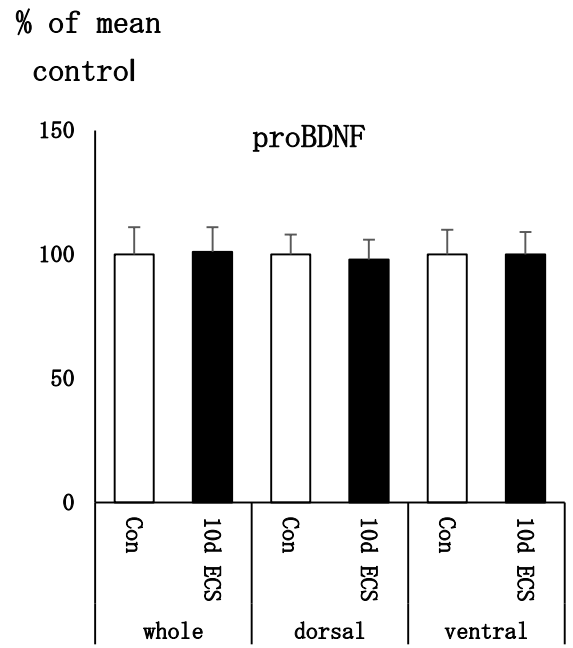
B)



C)



D)



## 図 7 の説明

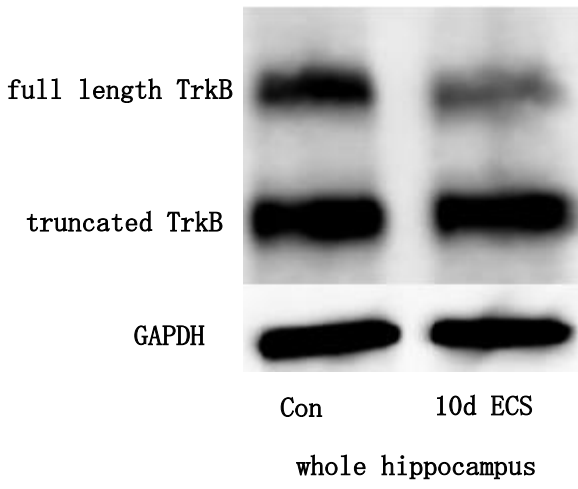
10 日間 ECS による海馬全域、背側海馬、腹側海馬の proBDNF 蛋白発現のウエスタンブロット法による分析

A, B, C) 10 日間の ECS による海馬全域 (A)、背側海馬 (B)、腹側海馬 (C)での proBDNF 蛋白発現変化について、ウエスタンブロット法で検出されたバンドの 1 例を提示している。

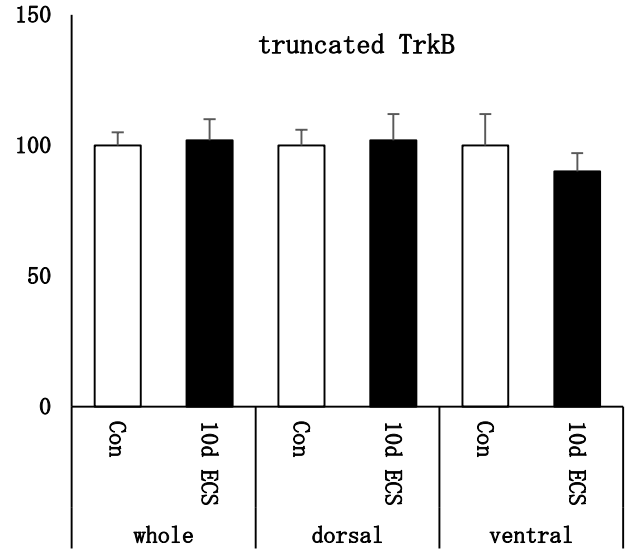
D) 海馬全域、背側海馬、腹側海馬の各領域における対照群 (Con) と、10 日間の電気けいれん刺激群 (10d ECS) の proBDNF 蛋白発現を、各群 7 匹のラットで比較した結果、全ての領域で、対照群と 10 日間電気けいれん刺激群の間に、統計学的有意差は検出されなかった。

8

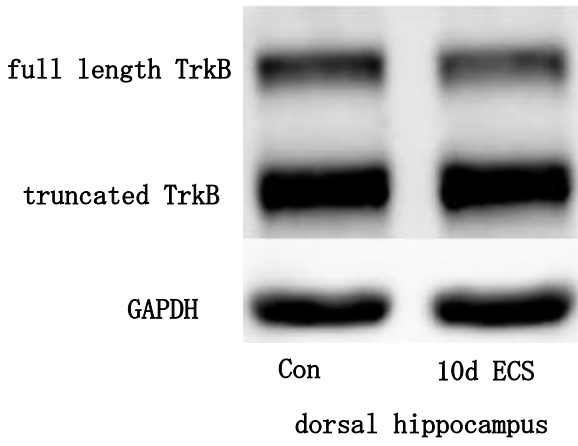
A)



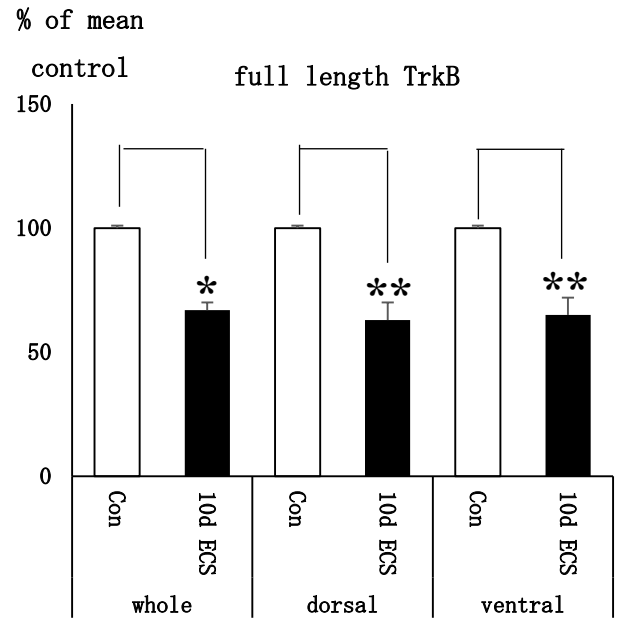
D) % of mean control



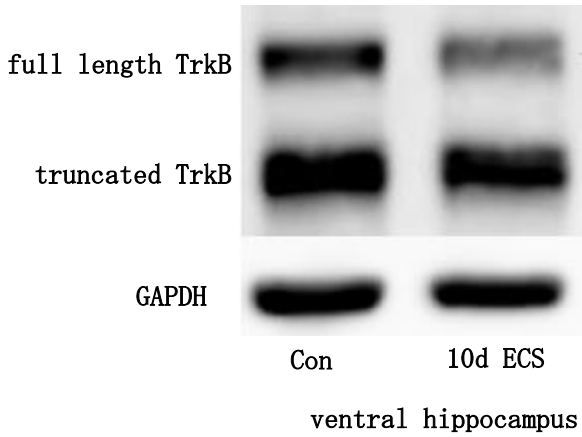
B)



E)



C)



## 図 8 の説明

10 日間 ECS による海馬全域、背側海馬、腹側海馬の full length TrkB、truncated TrkB 蛋白発現のウエスタンブロット法による分析

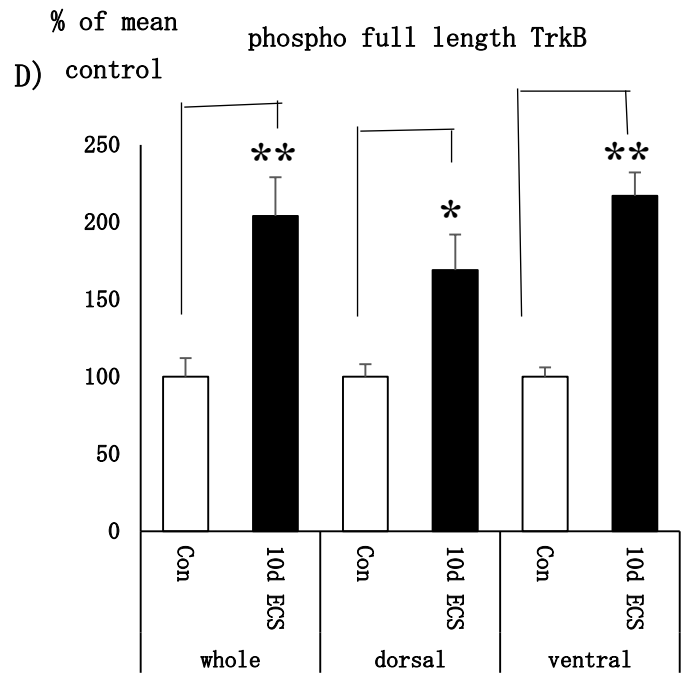
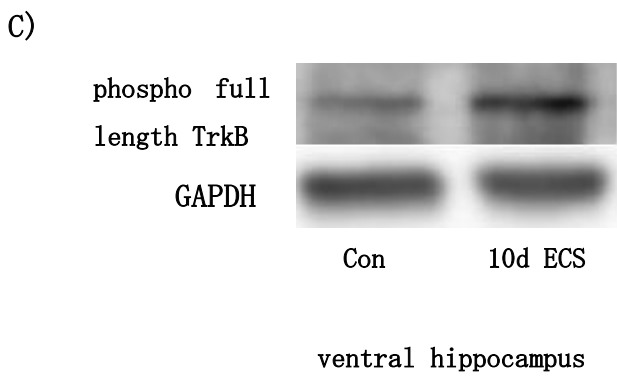
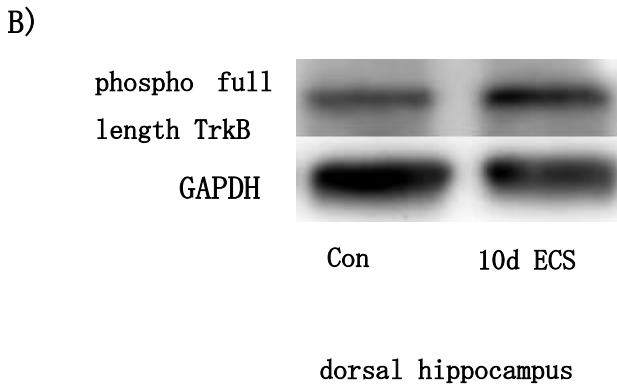
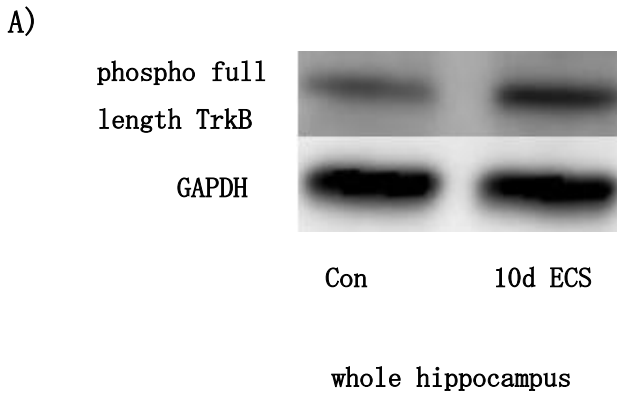
A, B, C) 10 日間の ECS による海馬全域 (A)、背側海馬 (B)、腹側海馬 (C)での full length TrkB、truncated TrkB 蛋白発現変化について、ウエスタンブロット法で検出されたバンドの 1 例を提示している。

D) 海馬全域、背側海馬、腹側海馬の各領域における対照群 (Con) と、10 日間の電気けいれん刺激群 (10d ECS) の truncated TrkB 蛋白発現を、各群 7 匹のラットで比較した結果、全ての領域で、対照群と 10 日間電気けいれん刺激群の間に、統計学的有意差は検出されなかった。

E) 海馬全域、背側海馬、腹側海馬の各領域における対照群 (Con) と、10 日間の電気けいれん刺激群 (10d ECS) の full length TrkB 蛋白発現を、各群 7 匹のラットで比較した結果、全ての領域で、10 日間の電気けいれん刺激群の蛋白発現は有意に減少した。\*  $p < 0.05$ 、

\*\*  $p < 0.01$

图 9





## 図 9 の説明

10 日間 ECS による海馬全域、背側海馬、腹側海馬のリン酸化 full length TrkB 蛋白発現のウエスタンブロット法による分析

A, B, C) 10 日間の ECS による海馬全域 (A)、背側海馬 (B)、腹側海馬 (C) でのリン酸化 full length TrkB 蛋白発現変化について、ウエスタンブロット法で検出されたバンドの 1 例を提示している。

D) 海馬全域、背側海馬、腹側海馬の各領域における対照群 (Con) と、10 日間の電気けいれん刺激群 (10d ECS) のリン酸化 full length TrkB 蛋白発現を、各群 7 匹のラットで比較した結果、全ての領域で、10 日間の電気けいれん刺激群の蛋白発現は有意に増加した。

\*  $p < 0.05$ 、\*\*  $p < 0.01$

図 10

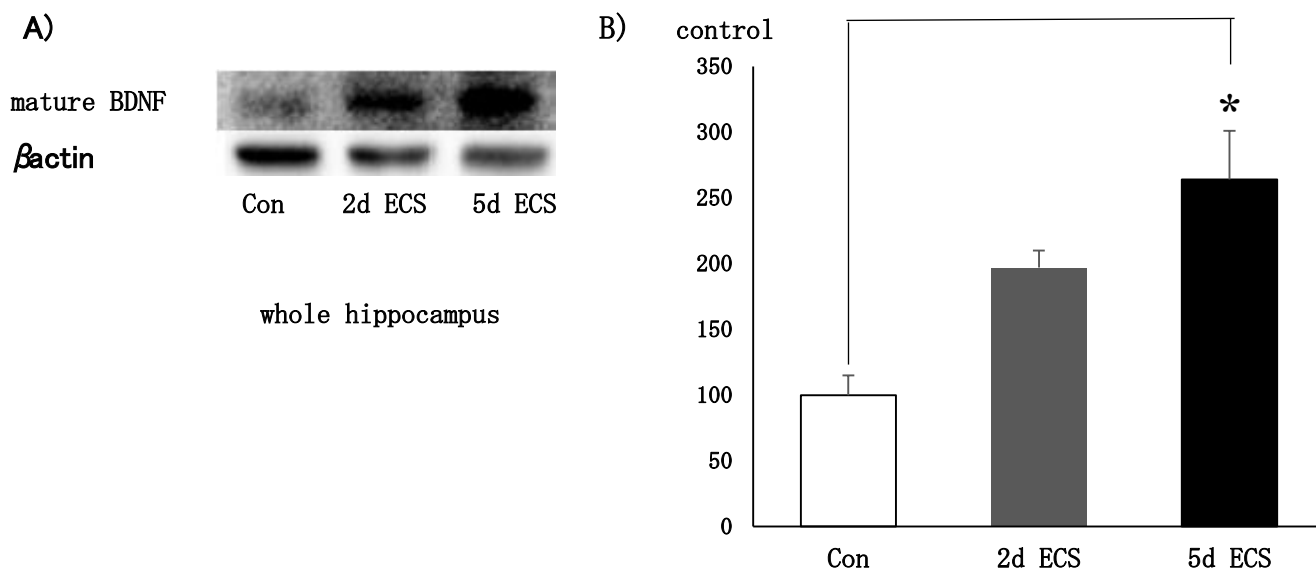
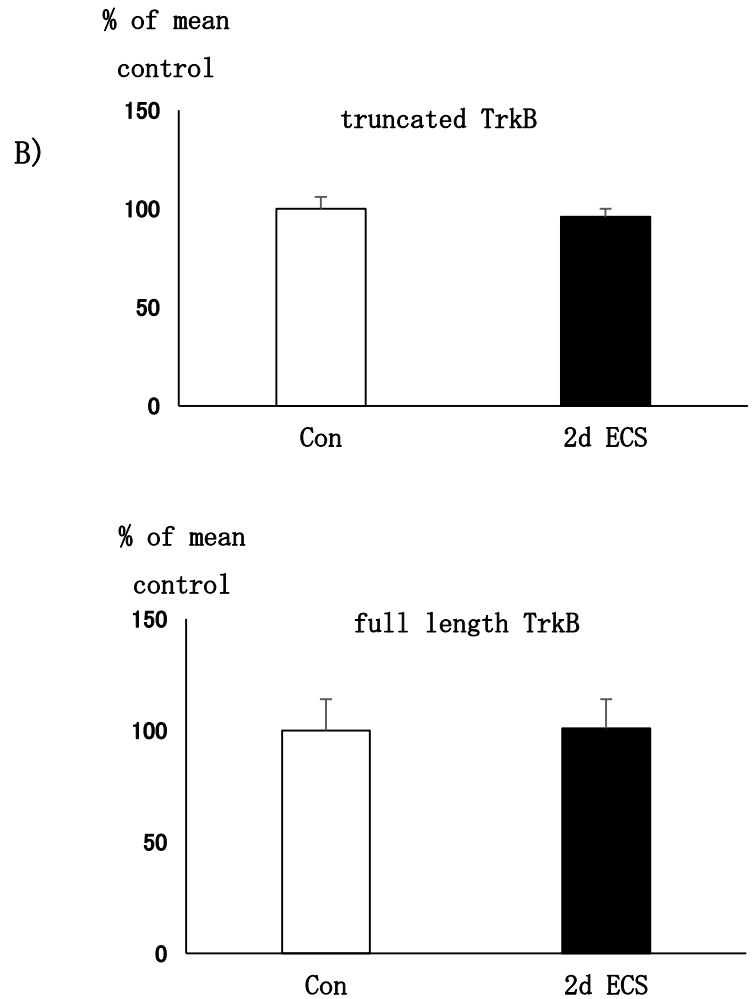
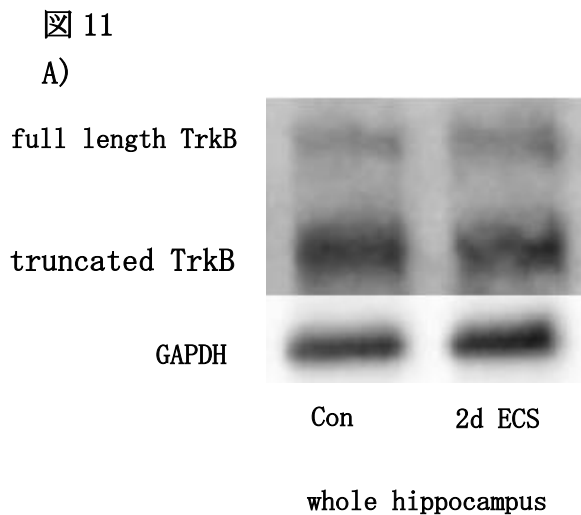


図 10 の説明

2 日間及び 5 日間 ECS による海馬全域の成熟型 BDNF 蛋白発現のウエスタンブロット法による分析

A) 2 日間及び 5 日間 ECS による海馬全域での成熟型 BDNF 蛋白発現変化について、ウエスタンブロット法で検出されたバンドの 1 例を提示している。

B) 対照群 (Con)、2 日間電気けいれん刺激群 (2d ECS)、5 日間電気けいれん刺激群 (5d ECS) の海馬全域での成熟型 BDNF 蛋白発現を各群 4 匹のラットで比較した結果、対照群と 5 日間電気けいれん刺激群の間で、統計学的有意差が検出された。\* $p < 0.05$



### 図 11 の説明

2 日間 ECS による海馬全域の truncated TrkB 及び full length TrkB 蛋白発現のウエスタンブロット法による分析

A) 2 日間 ECS による海馬全域での truncated TrkB 及び full length TrkB 蛋白発現変化について、ウエスタンブロット法で検出されたバンドの 1 例を提示している。

B) 対照群 (Con) と 2 日間電気けいれん刺激群 (2d ECS) の海馬全域での truncated TrkB 及び full length TrkB 蛋白発現を各群 4 匹のラットで比較した結果、統計学的有意差は検出されなかった。