

ドーパミン D1 受容体シグナルを介したマグネシウムによるストレスレジリエンスの解析

小林 克典

日本医科大学薬理学

概要 うつ病は有病率が高く、その克服は社会的な要請となっており、予防法の改善が現在の最重要課題と考えられる。うつ病発症の最大のリスクはストレスであるが、生体はストレスに対する順応機構であるレジリエンスを持っているため、多くの場合ストレスを受けてもうつ病を発症しない。レジリエンスのメカニズムの解明が、うつ病克服に向けた最も有効なアプローチと考えられる。マグネシウムは抗うつ作用を持つことが示唆されており、マグネシウム欠乏はうつ病と関連することが報告されているため、マグネシウムはストレスレジリエンス作用を持つ可能性がある。

マグネシウムは多様な酵素の調節に寄与するが、cAMP の産生酵素であるアデニル酸シクラーゼの活性を増強することが良く知られている。cAMP 経路は抗うつ作用に重要と考えられており、マグネシウムによる抗うつ作用等にも寄与する可能性が高い。cAMP 経路を活性化する受容体としてドーパミン D1 受容体があるが、海馬のドーパミン D1 受容体は抗うつ薬作用に寄与することが自身の結果を含む先行研究によって報告されている。我々は最近の解析によって、海馬のドーパミン D1 受容体がノルアドレナリンによって強く活性化されることを発見した。さらにこの D1 受容体活性化が運動やストレスによって増強されて、抗うつ薬の効果を促進することを示した。

本研究ではマグネシウムがマウスの海馬ドーパミン D1 受容体シグナルを増強して、ストレスレジリエンスをもたらす可能性を検討した。通常の飼育条件のマウスにおいて、マグネシウム欠乏食又は高マグネシウム水は、ノルアドレナリン投与による D1 受容体活性化に影響を及ぼさなかった。また、抗うつ薬投与時に見られる短期シナプス可塑性の変化も生じなかった。ストレス下のマウス及び回し車によって運動させたマウスでも、低マグネシウム、高マグネシウムの効果は見られなかった。また、ストレスによる活動量の低下にも明らかな効果は見られなかった。しかし、ストレスと運動を組み合わせた条件では、有意差はなかったが、低マグネシウム群において D1 受容体シグナルの低下が見られた。運動とストレスによって D1 受容体シグナルは増強されるため、マグネシウム欠乏はこの運動とストレスの相互作用に影響を及ぼす可能性が示唆された。今後、D1 受容体シグナルの増強における運動とストレスの相互作用について、現象とメカニズムの両者の解析を進めつつ、マグネシウムの作用を検討する必要があると考えられる。

1. 研究目的

うつ病は有病率が高く、その克服は社会的な要請となっている。コロナ禍における、うつ病患者の増加も報告されており⁽¹⁾、予防法の改善が現在の最重要課題と考えられる。うつ病発症の最大のリスクはストレスであるが、生体はストレスに対する順応機構である「レジリエンス」を持っているため、多くの場合ストレスを受けてもうつ病を発症しない。ストレスレジリエンスを高めれば、うつ病の予防と治

療の両者が改善される。したがって、レジリエンスのメカニズムの解明が、うつ病克服に向けた最も有効なアプローチと考えられる。本研究では、マグネシウムがレジリエンスに寄与する可能性に注目した。

マグネシウムは抗うつ作用を持つことが、臨床研究及び動物モデルを用いた研究によって示唆されている^(2,3)。マグネシウム欠乏はうつ病と関連することが報告されているため^(2,4)、マグネシウムはストレスレジリエンス作用を持つ

可能性がある。しかし、これらの作用のメカニズムは明らかではない。マグネシウムは多様な酵素の調節に寄与するが、cAMP の産生酵素であるアデニル酸シクラーゼの活性を増強することが良く知られている⁽⁵⁾。cAMP 経路は抗うつ作用に重要と考えられており、マグネシウムによる抗うつ作用等にも寄与する可能性が高い。

海馬のドパミン D1 受容体は抗うつ薬の作用に寄与することが、自身の結果を含む先行研究によって報告されている⁽⁶⁻⁹⁾。D1 受容体はアデニル酸シクラーゼを活性化させるため、マグネシウムもこのシグナル経路を増強することが予想される。我々は最近の解析によって、海馬のドパミン D1 受容体がノルアドレナリンによって強く活性化されることを発見し、さらにこの D1 受容体活性化とストレスレジリエンスの関係を示唆する結果を得た⁽⁶⁾。マウスに回し車による運動を行わせつつ、慢性ストレスを負荷すると、D1 受容体活性化による海馬シナプス修飾が増強され、この増強が抗うつ薬の効果を促進することが分かった (Fig. 1)。つまり、ノルアドレナリン-D1 受容体シグナルは、ストレスに対して順応的に働くレジリエンス機構と考えられる。マグネシウムはこのシグナル経路の増強によってレジリエンスを強化する可能性がある。注目すべきことに、海馬における D1 受容体シグナルの調節には正のフィードバック機構が存在する⁽⁷⁾。したがって、マグネシウム濃度の僅かな変化でも、他の要因との組み合わせによってその効果が増強され、D1 受容体シグナルに大きな影響を及ぼす可能性がある。さらに、マグネシウムを含む二価イオンの欠乏は、カテコラミン産生の律速酵素であるチロシン水酸化酵素の発現低下をもたらすことも知られている⁽¹⁰⁾。以上より、マグネシウムは海馬におけるドパミン D1 受容体シグナル経路の重要な調節因子と考えられる。

本研究ではマウスを用いて、マグネシウムが海馬ドパミン D1 受容体シグナルの調節を介して、ストレスレジリエンスとしての作用を持つ可能性を検証した。

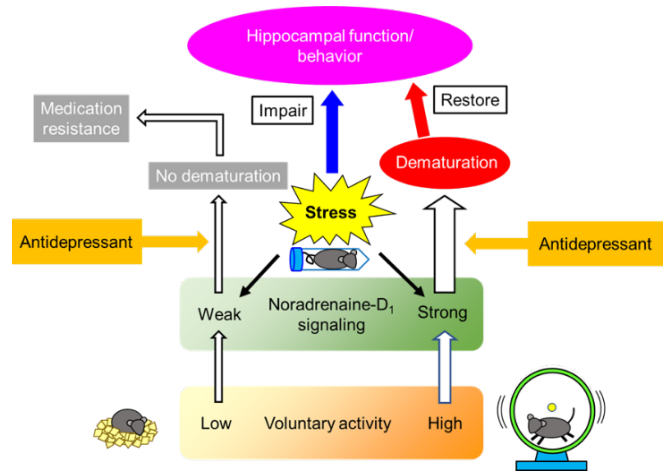


Fig. 1 A model of regulation of antidepressant responsiveness by noradrenaline-D1 receptor signaling. Chronic stress would impair hippocampal functioning and behavior. At the same time, stress augments hippocampal noradrenaline-D1 receptor signaling in individuals with high voluntary activity. Augmented noradrenaline-D1 receptor signaling facilitates the induction of dematuration, a reversal of neuronal maturation, by noradrenergic antidepressants. Dematuration can increase neuronal excitability and modulates synaptic plasticity, which may restore hippocampal functioning and behavior.

2. 研究方法

2.1 実験動物

実験にはオスの成体 C57BL/6J マウス(8~13 週齢)を用いた。通常は1 ケージ2~4 匹で飼育し、ストレス群及び運動群のマウスは、飼育室搬入から1 週間以上の馴化期間の後に個別飼育とした。エサは標準的飼料又は低マグネシウム飼料(マグネシウム無添加調整飼料 AIN93M, オリエンタル酵母)を与え、水は水道水又は高マグネシウム水(MgCl₂ 5 mg/ml)とし⁽¹¹⁾、自由に摂取可能とした。マウスの1 日の平均飲水量は約 4 ml であったため、体重あたりの摂取量は約 800 mg/kg/day となる。

2.2 電気生理学実験

イソフルランによる麻酔下のマウスを断頭し、氷冷生理溶液中で海馬の急性スライス標本(380 μm)を作製した。2 時間以上の回復期間の後に、細胞外記録法を用いてシナプス応答を記録した。記録チェンバーは 27~27.5°C に保たれ、標準的な生理溶液で常に灌流した。歯状回顆粒細胞層にタングステン製の双極刺激電極を刺入し、苔状線維由来の興奮性シナプス後電位を CA3 領域の透明層からガラス電極を用いて記録した⁽¹²⁾。本研究でシナプス応答を記録した苔状線維-CA3 シナプスは、精神疾患治療

の重要な標的になることを過去に提唱している⁽¹³⁾。特に記述が無い限り、電気刺激は 0.05 Hz で与えた。

苔状線維-CA3 シナプス応答の同定基準は、グループ II代謝型グルタミン酸受容体アゴニスト DCG-IV (1 μ M) による 85%以上の抑制とした⁽¹⁴⁾。ドパミンを投与すると D1 受容体の活性化によって、苔状線維-CA3 シナプス伝達が増強される^(8, 9, 14)。海馬のドパミン D1 受容体にはノルアドレナリン神経が関与することが示唆されており⁽¹⁵⁾、自身の直近の研究によって D1 受容体がノルアドレナリンによって活性化されることを明らかにした⁽⁶⁾。海馬に対するドパミン神経投射が少ないことや⁽¹⁵⁾、海馬のドパミン含量が他のモノアミンと比して非常に少ないこと⁽¹⁶⁾を考慮すると、海馬ドパミン D1 受容体の内因性アゴニストはノルアドレナリンの可能性が高い。また、ノルアドレナリン-D1 受容体シグナルは、ドパミン-D1 受容体シグナルよりも可塑性が高く⁽⁶⁾、ノルアドレナリン-D1 受容体シグナルの方が D1 受容体シグナルの変化が生じた際の検出感度が高いことから、本研究ではノルアドレナリンを D1 受容体活性化のために用いた。ノルアドレナリンは苔状線維-CA3 シナプスにおいてアドレナリン β 受容体も活性化するため⁽⁶⁾、 β 遮断薬のプロプラノロール (10 μ M) 存在下で記録を行った。

2.3 ホームケージ活動量測定とストレス負荷

マウスを赤外線カメラ付きケージで飼育し、水平方向の自発移動量を持続的にモニターした。日中の行動は飼育管理者などの行動の影響を受けるため、定量的解析には夜間の移動量を用いた。慢性拘束ストレスの影響を検討するため、空気穴を開けた 50 ml チューブにマウスを 1 日 2 時間入れた。ベースラインの移動量を一週間記録した後、拘束ストレスを 3 週間負荷した。先行研究によって、拘束ストレスが夜間自発移動量を低下させることが分かっている⁽⁶⁾。運動を行わせる場合は、ケージに回し車を入れた。運動とストレスを組み合わせた実験では、回し車を 1 週間行かせた後に、回し車も継続しつつストレスを負荷した。

3. 研究結果

3.1 通常飼育下におけるマグネシウム摂取量変化の効果

海馬スライス標本において、ノルアドレナリンを灌流投与すると苔状線維-CA3 シナプス伝達が増強される。このシナプス増強はアドレナリン β 受容体とドパミン D1 受容体によって担われており、 β 遮断薬存在下では D1 受容体依存性のシナプス増強のみが観察される⁽⁶⁾。

本研究においては、D1 受容体活性化の効果に注目しているため、 β 遮断薬存在下にノルアドレナリンを投与した (10 μ M)。コントロール条件のマウスにおいて、ノルアドレナリンの投与によって誘導した、ドパミン D1 受容体活性化によるシナプス増強の典型例を **Fig. 2A** に示す。低マグネシウム、又は高マグネシウム条件で飼育したマウスでも同様のシナプス増強が観察され、これらの間に有意差は見られなかった (**Fig. 2B**)。次にマグネシウムが抗うつ薬様の作用を持つ可能性を検討した。抗うつ薬の慢性投与や電気痙攣処置によって、成体マウス海馬神経細胞の成熟の逆行(脱成熟)が生じることを過去に示した^(6, 17-21)。脱成熟が生じると苔状線維-CA3 シナプス伝達の性質が幼若動物様に変化する。成体マウスにおいて、刺激頻度を 0.05 Hz から 1 Hz に上昇させることによって、顕著なシナプス促進が観察される (**Fig. 2C**)。この顕著なシナプス促進は成体マウスの特徴であり、脱成熟が生じるとシナプス促進が低下するため、シナプス促進の程度が神経成熟度の指標となる^(6, 17-21)。コントロール条件、低マグネシウム飼育、高マグネシウム飼育の間でシナプス促進の大きさに差は見られなかった (**Fig. 2D**)。したがって、マグネシウム摂取量に変化しても脱成熟は生じないと考えられる。

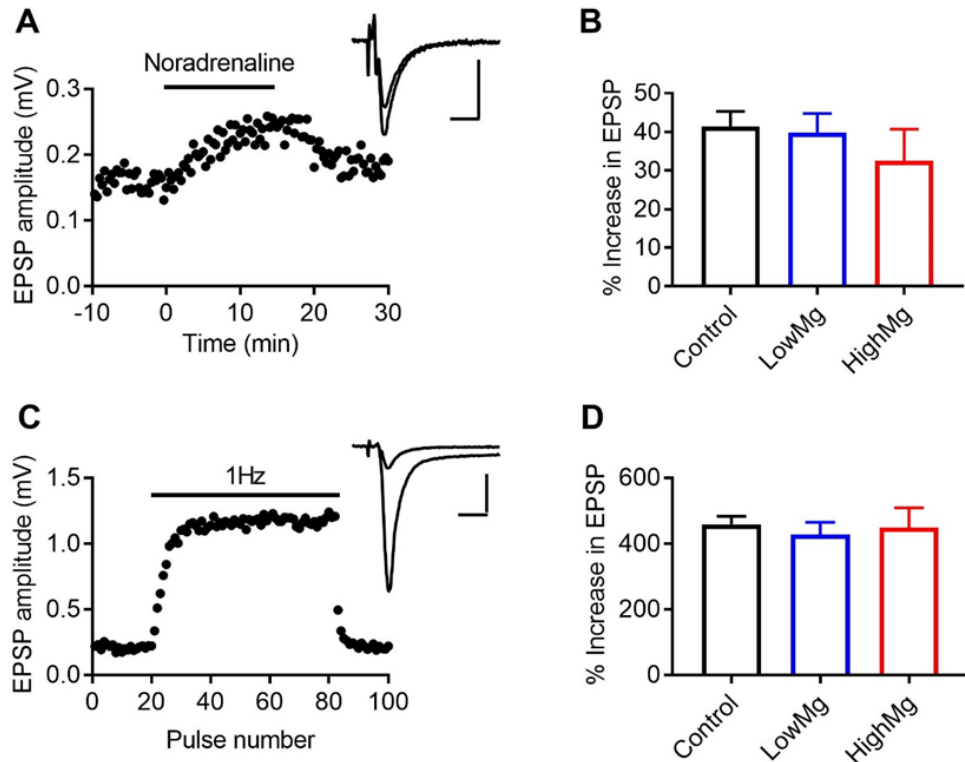


Fig. 2 Effects of magnesium deficiency and supplementation on mossy fiber synaptic transmission and modulation in naïve mice. (A) Typical example of noradrenaline (NA)-induced synaptic potentiation in the presence of propranolol. Sample traces show averaged field potentials before and during NA application. Scale bars: 10 ms, 0.2 mV. (B) Pooled data showing effects of magnesium deficiency and supplementation on NA-induced synaptic potentiation. (C) Typical example of synaptic facilitation induced by 1 Hz stimulation. Sample traces show averaged field potentials before and during 1 Hz stimulation. Scale bars: 10 ms, 0.5 mV. (D) Pooled data showing effects of magnesium deficiency and supplementation on synaptic facilitation.

3. 2 ストレス群におけるマグネシウム摂取量変化の効果

次に慢性拘束ストレス下におけるマグネシウム摂取量変化の効果を検討した。拘束ストレスそのものはノルアドレナリンの効果に影響はなかった⁶⁾。ストレス負荷条件においても、マグネシウム摂取量の変化はD1受容体依存性のシナプス増強に対して有意な効果を持たなかった (**Fig. 3A**)。拘束ストレスはケージ内における自発活動量を低下させるが⁶⁾、マグネシウム摂取量が増えたり減ってもストレスによる活動低下に大きな違いは見られなかった (**Fig. 3B**)。

3. 3 運動群におけるマグネシウム摂取量変化の効果

次に回し車による自発運動が可能な条件で同様の解析を行った。自発運動はノルアドレナリンによるD1受容体

活性化の効果を増強することが分かっている⁶⁾。通常飼育群及びストレス群と比較して、運動群では全てのマグネシウム摂取量条件で、D1受容体活性化によるシナプス増強が亢進していた (**Fig. 4A**)。しかし、運動群内において、マグネシウム摂取量の違いによるシナプス増強の差は検出されなかった (**Fig. 4A**)。

最後に運動とストレス負荷を組み合わせた条件での検討を行った。低マグネシウム群とコントロール群の比較のみ行ったところ、両者の間に有意差は見られなかったが、低マグネシウム群でノルアドレナリンの効果が抑制傾向にあった (**Fig. 4B**)。

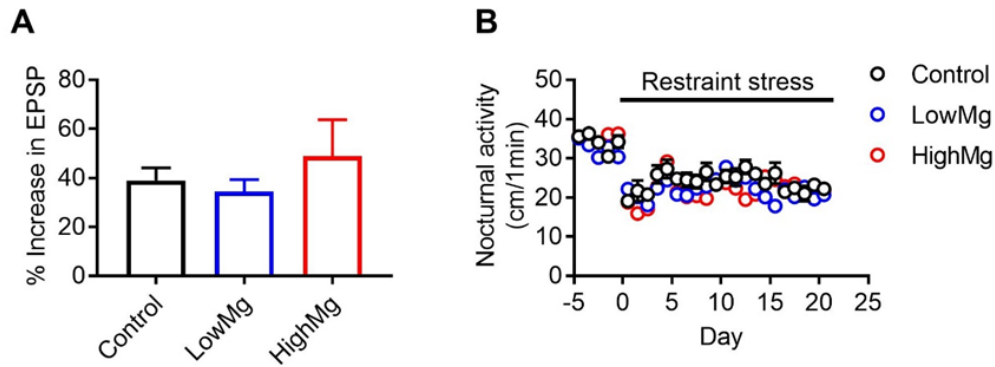


Fig. 3 Effects of magnesium deficiency and supplementation in stressed mice. (A) Pooled data showing effects of magnesium deficiency and supplementation on NA-induced synaptic potentiation. (B) Effects of restraint stress on home cage activity in control, magnesium-deficient and magnesium-supplemented mice.

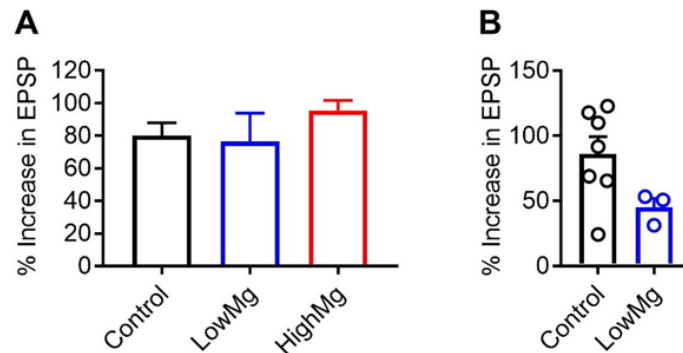


Fig. 4 Effects of magnesium deficiency and supplementation in mice subjected to wheel running. (A) Typical example of noradrenaline (NA)-induced synaptic potentiation in the presence of propranolol. Sample traces show averaged field potentials before and during NA application. Scale bars: 10 ms, 0.2 mV. (B) Pooled data showing effects of magnesium deficiency on NA-induced synaptic potentiation in mice subjected to restraint stress and wheel running.

4. 考察

本研究において、マグネシウムの摂取量の違いによる D1 受容体シグナルの変化は、いかなる群においても見られなかった。直近の研究によって、海馬のドパミン D1 受容体はノルアドレナリンによって活性化されることが分かったため⁶⁾、本研究では D1 受容体シグナルの活性化にノルアドレナリンを用いた。ノルアドレナリン-D1 受容体シグナルはドパミン-D1 受容体シグナルよりも、神経活動などに依存して大きく変化するため、本研究でもドパミンを用いるよりも、軽微な変化が検出可能であったと考えられる。また、海馬のドパミン D1 受容体の内因性の伝達物資はノルアドレナリンと考えられるため⁴⁾、仮にドパミン-D1 受容体シグナルに変化があったとしても、ノルアドレナリン-D1 受容体

シグナルに変化が見られなければ、生理的な意義に疑問が生じることになる。

運動群とストレス群においては、低マグネシウム、高マグネシウムでそれぞれ抑制、増強傾向が見られた。また、運動+ストレス群においては、有意差は無かったものの、低マグネシウム群において抑制が見られた。この一貫した傾向を考慮すると、何らかの経験と組み合わせることによって、マグネシウム摂取量の違いの効果が検出可能になると考えられる。実際、運動+ストレス群においては、見かけ上、低マグネシウムによって D1 受容体シグナルが抑制されているが、コントロール群におけるデータの変動が大きかったため有意差が出なかった。今後、条件検討を行うことによって、有意差が得られる可能性がある。しかし、マ

グネシウム摂取量変化の効果が運動＋ストレス群で特異的に見られるのであれば、マグネシウムは運動とストレスの相互作用に対して影響を及ぼす可能性が高く、研究開始時に想定したような、D1 受容体シグナルに対する直接的な効果とは異なると考えられる。直近の研究では運動とストレスはノルアドレナリン-D1 受容体シグナルに対して明らかな相乗効果があったが⁶⁾、本研究ではその効果が小さかった(10%弱)。この違いは、研究の目的上、ストレス条件及び運動と組み合わせるタイミングを変えたことに起因すると考えられる。したがって、運動とストレスの相互作用には、条件の微妙な違いが結果に大きく反映されるような調節機構が関与しており、マグネシウムはその調節機構に影響を及ぼす可能性が考えられる。

5. 今後の課題

本研究では、当初想定していたような、D1 受容体シグナルに対するマグネシウムの明らかな効果は示されなかったが、運動とストレスの相互作用に対する効果が示唆された。D1 受容体シグナルに対する運動＋ストレスの効果は、微妙な条件の違いによって異なるため、今後現象面の条件検討を充分行い、その上で改めてマグネシウムの影響を検討する必要がある。運動とストレスの相互作用については、そのメカニズムも現時点では不明であり、メカニズムの解明と併せてマグネシウムの標的の検討も行うことによって、理解が深まると予想される。しかし、今回の検討では、極端な欠乏又は増量の効果を検討したため、今後明らかな効果が検出された場合は、ヒトへの応用を考慮してより慎重な検討が必要になると考えられる。

6. 文献

1. Santomauro et al., COVID-19 Mental Disorders Collaborators. Global prevalence and burden of depressive and anxiety disorders in 204 countries and territories in 2020 due to the COVID-19 pandemic. *Lancet* 2021; 398:1700-1712.
2. Serefko A, Szopa A, Wlaz P, Nowak G, Radziwoń-Zaleska M, Skalski M, Poleszak E. Magnesium in depression. *Pharmacol Rep* 2013; 65:547-554.
3. Nazarinasab M, Behrouzian F, Abdi L, Sadegh Moghaddam AA, Sadeghi S. Investigating the effect of magnesium supplement in patients with major depressive disorder under selective serotonin reuptake inhibitor treatment. *J Family Med Prim Care* 2022; 11: 7800-7805.
4. Tarleton EK, Kennedy AG, Rose GL, Crocker A, Littenberg B. The association between serum magnesium levels and depression in an adult primary care population. *Nutrients* 2019; 11: 1475.
5. Swaminathan R. Magnesium metabolism and its disorders. *Clin Biochem Rev.* 2003; 24:47-66.
6. Kobayashi K, Shikano K, Kuroiwa M, Horikawa M, Ito W, Nishi A, Segi-Nishida E, Suzuki H. Noradrenaline activation of hippocampal dopamine D1 receptors promotes antidepressant effects. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2022; 119: e2117903119.
7. Shuto T, Kuroiwa M, Sotogaku N, Kawahara Y, Oh YS, Jang JH, Shin CH, Ohnishi YN, Hanada Y, Miyakawa T, Kim Y, Greengard P, Nishi A. Obligatory roles of dopamine D1 receptors in the dentate gyrus in antidepressant actions of a selective serotonin reuptake inhibitor, fluoxetine. *Mol Psychiatry* 2020; 25: 1229-1244.
8. Kobayashi K, Imoto Y, Yamamoto F, Kawasaki M, Ueno M, Segi-Nishida E, Suzuki H. Rapid and lasting enhancement of dopaminergic modulation at the hippocampal mossy fiber synapse by electroconvulsive treatment. *J Neurophysiol* 2017; 117: 284-289.
9. Kobayashi K, Haneda E, Higuchi M, Suhara T, Suzuki H. Chronic fluoxetine selectively upregulates dopamine D1-like receptors in the hippocampus. *Neuropsychopharmacology* 2012; 37: 1500-1508.
10. Taniguchi R, Nakagawasai O, Tan-no K, Yamadera F, Nemoto W, Sato S, Yaoita F, Tadano T. Combined low calcium and lack magnesium is a risk factor for motor deficit in mice. *Biosci Biotechnol Biochem* 2013; 77: 266-270.
11. Macías-Carballo M, Rosas-Navarro S, López-Meraz ML, Beltran-Parrazal L, Morgado-Valle C. Anxiolytic effect of chronic intake of supplemental magnesium chloride in rat. *Behav Brain Res* 2021; 413: 113460.
12. Kobayashi K, Mikahara Y, Murata Y, Morita D, Matsuura S, Segi-Nishida E, Suzuki H. Predominant role of serotonin at the hippocampal mossy fiber synapse with redundant monoaminergic modulation.

- iScience 2020; 23: 101025.
13. Kobayashi K. Targeting the hippocampal mossy fiber synapse for the treatment of psychiatric disorders. *Mol Neurobiol* 2009; 39: 24-36.
 14. Kobayashi K, Suzuki H. Dopamine selectively potentiates hippocampal mossy fiber to CA3 synaptic transmission. *Neuropharmacology* 2007; 52 :552-561.
 15. Takeuchi T, Duzskiewicz AJ, Sonneborn A, Spooner PA, Yamasaki M, Watanabe M, Smith CC, Fernández G, Deisseroth K, Greene RW, Morris RG. Locus coeruleus and dopaminergic consolidation of everyday memory. *Nature* 2016; 537: 357-362.
 16. Schmidt RH, Bhatnagar RK. Assessment of the effects of neonatal subcutaneous 6-hydroxydopamine on noradrenergic and dopaminergic innervation of the cerebral cortex. *Brain Res* 1979; 166: 309-319.
 17. Kobayashi K, Ikeda Y, Sakai A, Yamasaki N, Haneda E, Miyakawa T, Suzuki H. Reversal of hippocampal neuronal maturation by serotonergic antidepressants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 8434-8439.
 18. Kobayashi K, Ikeda Y, Suzuki H. Behavioral destabilization induced by the selective serotonin reuptake inhibitor fluoxetine. *Mol Brain* 2011; 4: 12.
 19. Kobayashi K, Ikeda Y, Asada M, Inagaki H, Kawada T, Suzuki H. Corticosterone facilitates fluoxetine-induced neuronal plasticity in the hippocampus. *PLoS One* 2013; 8: e63662.
 20. Imoto Y, Kira T, Sukeno M, Nishitani N, Nagayasu K, Nakagawa T, Kaneko S, Kobayashi K, Segi-Nishida E. Role of the 5-HT4 receptor in chronic fluoxetine treatment-induced neurogenic activity and granule cell dematuration in the dentate gyrus. *Mol Brain* 2015; 8:29.
 21. Imoto Y, Segi-Nishida E, Suzuki H, Kobayashi K. Rapid and stable changes in maturation-related phenotypes of the adult hippocampal neurons by electroconvulsive treatment. *Mol Brain* 2017; 10: 8.

Magnesium-Induced Stress Resilience Mediated by Dopamine D1 Receptor Signaling

Katsunori Kobayashi

Nippon Medical School

Summary

Because of the high prevalence of depression, improvement of prevention methods is the most important issue. The greatest risk for depression is stress, but most people do not develop depression even if they are stressed, because they have an adaptive mechanism for stress called resilience. Elucidating the mechanism of resilience would be an effective approach to overcome depression. Since magnesium deficiency has been reported to be associated with depression, magnesium may have stress resilience effects. Magnesium contributes to the regulation of various enzymes and is known to enhance the activity of adenylyl cyclase, a cAMP-producing enzyme. Since cAMP pathway is thought to be important for antidepressant effects, magnesium may contribute to prevention of depression by enhancing this pathway. Previous studies, including our own, have shown that hippocampal dopamine D1 receptors contribute to antidepressant effects. Since D1 receptors activate adenylyl cyclase, magnesium is expected to enhance this signaling pathway.

In our recent study, we found that hippocampal dopamine D1 receptors are strongly activated by noradrenaline. Furthermore, we showed that this D1 receptor activation is enhanced by exercise and stress and promotes the effects of antidepressants. In the present study, we investigated the possibility that magnesium enhances hippocampal dopamine D1 receptor signaling in mice, resulting in stress resilience. In naïve mice, magnesium-deficient diets or magnesium supplementation had no effect on D1 receptor activation induced by noradrenaline. No effects of low or high magnesium were observed in mice under stress or subjected to wheel running. There was also no apparent effect on hypoactivity seen in stressed mice. However, under the combined stress and exercise condition, there was an apparent decrease in D1 receptor signaling in the low magnesium group, although the difference was not statistically significant. We have shown that stress and exercise cooperatively enhance the D1 receptor signaling. The present results suggest that the magnesium deficiency may affect this interaction between exercise and stress rather than D1 receptor signaling itself.