

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09846

研究課題名(和文)電気けいれん療法はなぜ効果があるのか—細胞内カルシウムシグナル系との関係—

研究課題名(英文)The mechanism of electroconvulsive therapy—the involvement of intracellular Ca²⁺ signaling

研究代表者

宮本 修 (Miyamoto, Osamu)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：00253287

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ストレス誘導のマウスうつモデルを用いて、電気刺激(ECS)による改善効果の作用機序を、海馬のCa²⁺シグナル系に焦点を当て、調べた。CaMKキナーゼ と は有意な変化は見られなかったが、IP3Rやリアノジン受容体(RyR)はストレス負荷後に増え、ECSはこの増加を抑制した。しかし、いずれもメッセンジャーレベルに変化はなかった。さらに、RyRのアンタゴニストであるダントロレン投与によりECSの行動改善効果が抑制された。IP3RやRyRの分解を抑制することによって細胞内Ca²⁺濃度の維持を図る機序が生じたことが考えられ、ECSは細胞内Ca²⁺の低下を防ぐことでうつ状態を改善させた可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We have investigated it using mouse depression model focusing on intracellular Ca²⁺ signaling system in the hippocampus. The model were made by chronic stress (water immersion with restriction) and electroconvulsive shock (ECS) was given once a day for 2 weeks after completion of depression. Depression like behaviors such as forced swimming test (FST) and novelty suppression feeding test (NSF) were observed in the model mice, and ECS improved these abnormalities. Both inositol trisphosphate receptor (IP3R) and ryanodine receptors (RyRs) which were Ca²⁺ modulating factors were increased by chronic stress, while CaMK were not changed. Furthermore, dantrolene which is RyRs antagonist inhibited the effects of ECS in both FST and NSF. These results suggest that the upregulation of Ca²⁺ signaling system might be occurred by the stress induced suppression in neuronal activity of the hippocampus and ECT might activate it by the increase of intracellular Ca²⁺.

研究分野：神経生理学

キーワード：電気けいれん療法 ストレス うつ様モデル カルシウムシグナル系 リアノジン受容体 イノシトール三リン酸受容体 マウス

1. 研究開始当初の背景

電気けいれん療法 (electoconvulsive therapy: ECT) は、薬剤抵抗性のうつ病や統合失調症などに対して電気刺激でけいれんを誘発する有効性の確立した治療法である。ECT の効果は迅速であり、重篤な精神状態による身体的な緊急性が高い場合には最も有用な治療法の一つとされている。ECT の抗精神病作用の機序についてはこれまで多くの基礎研究があり、ドーパミンやセロトニンなどの神経伝達物質の変化、BDNF などの神経栄養因子の増加、海馬神経細胞新生やシナプス形成の増加などが報告されている。しかしながら、ECT が有効な症例においても神経伝達物質や BDNF は変化していないという報告もあり、未だその機序はよく分かっていない。

我々はこれまで電気刺激を繰り返すことでてんかんモデル (キンドリング動物) を作製して、てんかん原性獲得の機序とその治療法について研究してきた。また、電気刺激と同じ細胞の過剰な興奮状態である虚血に関する研究から、軽微な虚血に伴う細胞内 Ca^{2+} の上昇によって Ca^{2+} 制御に関与しているリアノジン受容体の変化し、このことが神経細胞保護効果 (虚血耐性) の形成と維持に関与する可能性を報告している。ECT においても興奮性アミノ酸の放出とその後に細胞内 Ca^{2+} の上昇が生じて Ca^{2+} シグナル系に変化が起こることで、細胞特性の変化や神経回路の再構築を引き起こしている可能性がある。 Ca^{2+} はセカンドメッセンジャーの一つとして細胞内情報伝達系の上流に位置しており、神経細胞の生理機能だけではなくてんかんや虚血など様々な病態に関わっている。ECT の多彩な効果やその迅速性を考えると、ECT の作用機序に関わる因子として Ca^{2+} シグナル系は有望な候補であると思われる。

2. 研究の目的

本研究では、うつ病モデル動物を使って、うつ状態および ECT が Ca^{2+} シグナル系にどのような変化を与えるかについて明らかにすることを目的とした。

細胞内 Ca^{2+} 濃度は、細胞外からの流入 Ca^{2+} や代謝性受容体を介したシグナルが、細胞内

Ca^{2+} の貯蔵庫である小胞体に存在する Ca^{2+} チャネルに作用することで主に調節されている。この Ca^{2+} チャネルにはリアノジン受容体 (RyR; 3つのアイソフォームがあり、いずれも脳に存在する) とイノシトール 1,4,5-三リン酸受容体 (IP_3R) があり、本研究ではこの両者について ECT との関係を検討した。さらに、その下流に位置するカルモデュリンキナーゼ (CaMK) は社会行動や精神疾患に関与することが報告されていることから、ECT によるこれらの変化についても調べた。

3. 研究の方法

(1) うつ様モデル動物 (ストレスモデル) の作製と電気けいれん刺激 (electoconvulsive shock: ECS)

8週齢雄マウスを、ストレス (Stress) 群、ECS 群、Stress + ECS 群、正常群 (Normal) の4群に分けた。Stress 負荷は拘束・水浸処置を1日3~7時間、2週間連続行い、うつ様モデルを作製した。行動解析 (体重変化、自発行動量、オープンフィールド試験、強制水泳試験 (FST)、新奇環境摂食抑制試験 (NST)) はストレス負荷終了2週間後に行った。ECS は、イソフルランおよびペントバルビタール麻酔下で、刺激は耳用電極を用い、刺激強度 80Hz x 30mA x 1.2s (痙攣持続時間10秒前後) として1日1回で計10回行った。また、ECS 期間中に1日おきに BrdU 溶液を腹腔内投与し、行動試験終了後、海馬歯状回における新生神経細胞数を BrdU とダブルコロチンとの二重染色によって計測した。

(2) マイクロダイアリシス

所定の ECS 刺激終了1週間前にダイアリシス用のプローブをマウス片側海馬あるいは側坐核に埋め込み、ECS 最終刺激2日後にマイクロダイアリシスを行った。HPLC-ECD (エイコム社製) を用いて灌流液中のドーパミンとセロトニンを測定した。

(3) Ca^{2+} シグナル関連タンパクの解析

ストレス負荷1日後 (ECS1 回後)、4日後 (ECS3 回後)、15日後 (ECS10 回後) にそれぞれ海馬を取り出し定法に従ってウェスタンブロット用と PCR 用に各サンプルを調整した。 Ca^{2+} シグナル関連タンパクとして、うつ

病との関連がすでに報告されている脳由来神経栄養因子 (BDNF) および CaM キナーゼについて検討した。さらに、細胞内 Ca^{2+} 濃度の調節因子である小胞体イノシトール三リン酸受容体 (IP_3R) とリアノジン受容体 ($RyR1\sim3$) について解析を行った。電気泳動後、各一次抗体と反応させ ECL にてバンドを検出した。各群の検出バンドは正常マウスのバンドを 100 としてその比率で表した。また、PCR については mRNA 抽出後、PrimeScript RT Master Kit で cDNA を合成した。各ターゲットおよびハウスキーピング遺伝子 (GAPDH、18S) に対する TaqMan probe (Applied Biosystems) cDNA、TaqMan Fast Advanced Master Mix (ABI) を混和、StepOnePlus (Applied Biosystems) にて mRNA を計測した。

(4) ダントロレンの効果

ECS における RyR の関与を調べるために、 RyR アンタゴニストであるダントロレンの投与実験を行った。ストレス負荷終了後の各 ECS 処置直前にダントロレン 10mg/kg または 20mg/kg を腹腔内投与した。ECS10 回終了後に FST と NSF 試験を行った。

4. 研究成果

(1) 行動試験 (図 1~3)

正常群に比べてストレス群の体重増加は有意に少なく ($p < 0.001$)、ECS を施行することによって体重が増加し、最終刺激時点では正常群と同程度に戻った (データ略)。自発運動量は各群で差はなかったが (データ略)、オープンフィールド試験ではストレスによって有意に増加した中心部での滞在時間が ECS によって正常群レベルに戻り (図 1) FST および NST においてストレスで増加した不動時間も ECS 処置で正常レベルに戻った (図 2)。図 3 に海馬歯状回における新生神経細胞数を示す。ストレス群で新生細胞数が減少したが、ECS によって増加した。以上、いずれの試験においてもストレス群はうつ様状態を示し、ECS はうつ様状態を改善した。

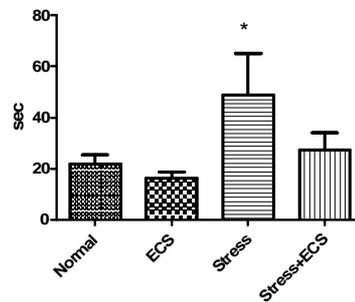


図 1 オープンフィールド (*: $p < 0.05$ vs ECS)

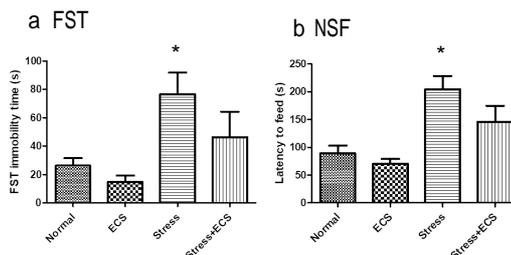


図 2 強制水泳試験 (a) と新奇環境摂食抑制試験 (b) (*: $p < 0.05$ vs normal)

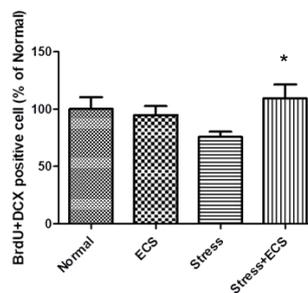


図 3 海馬歯状回における新生神経細胞数 (* $p < 0.05$ vs Stress)

(2) マイクロダイアリシス (図 4)

海馬および側坐核のドーパミンとセロトニン量はストレス群で減少傾向があったが有意な差はなく、また ECS でも変化は見られなかった。

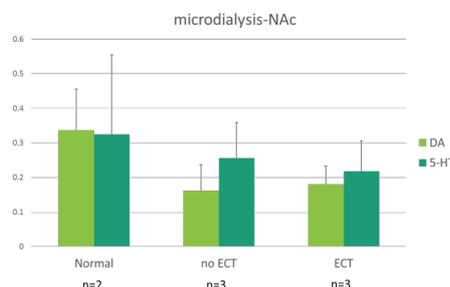


図 4. 側坐核における ECS によるドーパミンとセロトニン量の変化

(3) Ca²⁺シグナル関連タンパク (図5~7)

BDNF、CaMK、CaMK についてはいずれの時期も群間で有意な違いは見られなかった (図5)。IP₃R は Stress 群でストレス負荷終了直後に増え、その後徐々に減少して2週間後に元のレベルに戻り、ECS はこの回復を促進した (Stress + ECS 群、図6)。一方、RyR1 と RyR3 はストレス終了後に徐々に増え、2週間で正常群の2倍量を超えた ($p < 0.01$ vs Normal 群、図6)。ECS はストレスによる RyR の増加を抑制した ($p < 0.01$ vs Stress 群)。また、メッセンジャーレベルでは、IP₃R と RyR のいずれにも有意な変化は見られなかった (図7)。

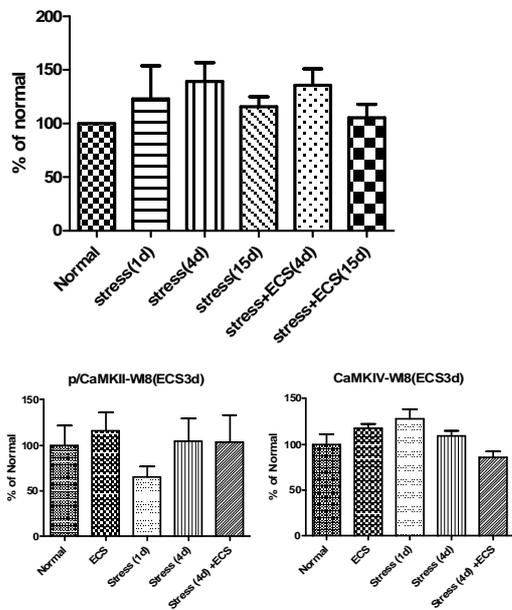


図5 ストレス負荷終了 BDNF タンパク発現量の経時変化(a)と、負荷終了1~4日後の CaMK (b)および CaMK (c)のタンパク量の変化

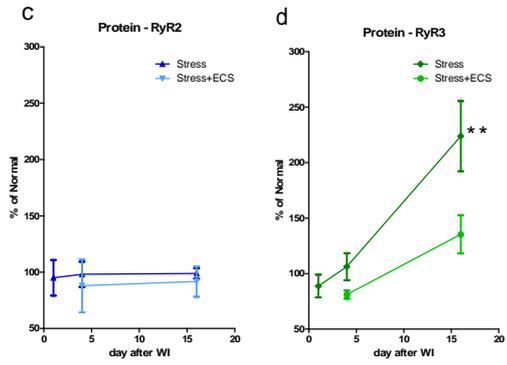
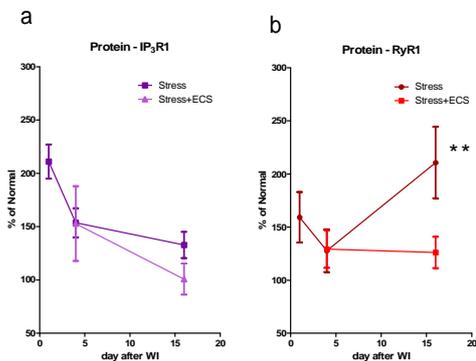


図6 IP₃R と RyR のタンパク量の経時変化 (a:IP₃R、b:RyR1、c:RyR2、d:RyR3) (** $p < 0.01$ vs Normal)

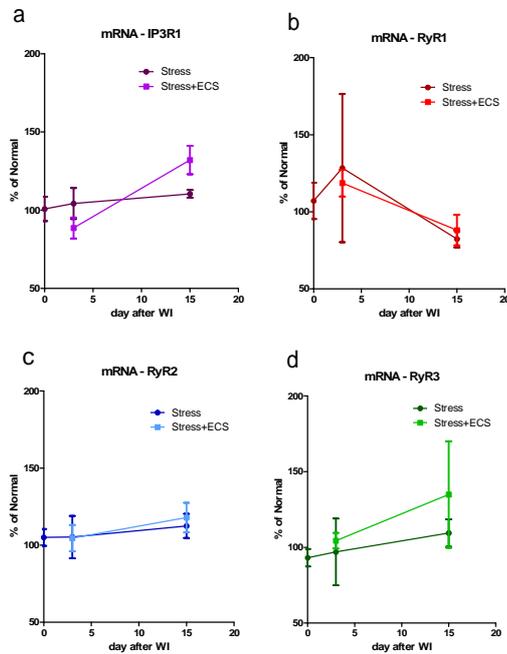


図7 IP₃R と RyR の mRNA 量の経時変化(a:IP₃R、b:RyR1、c:RyR2、d:RyR3)

(4) ダントロレンの効果 (図8)

ストレス負荷によって FST と NSF における不動時間が有意に増加し ($p < 0.01 \sim 0.05$)、ECS は不動時間の増加を抑制した。この ECS の効果は刺激前のダントロレン投与によって抑制された ($p < 0.01$)。

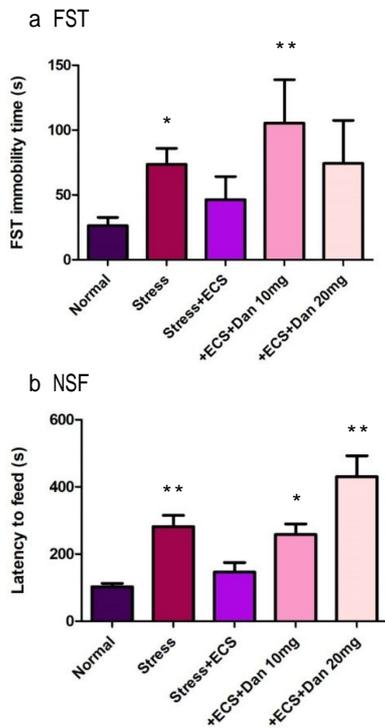


図 8 強制水泳試験 (a) と新奇環境摂食抑制試験 (b) におけるダントロレンの効果 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs Normal)

4. 考察

マウスへの慢性ストレスによってうつ様行動が生じ、それらの行動異常が ECS によって正常レベルに戻った。脳への電気刺激により神経活動が過剰に活性化されいれんが生じる。この神経活動の活性化は細胞内 Ca^{2+} の上昇を引き起こして様々な Ca^{2+} 関連の因子が活性化される⁴⁾。そこで、ECS の作用機序を探るために本研究ではストレスによって最も影響を受ける脳部位の一つである海馬において、ストレス負荷および ECS に伴う Ca^{2+} 関連タンパクの変化を調べた。

今回、CaMK と CaMK についてはストレス負荷や ECS による有意な変化は見られなかったが、小胞体に存在して細胞内 Ca^{2+} 濃度を調節している IP_3R と RyR はストレス負荷によって増加した。特に RyR タンパクはストレス負荷終了後 2 週間で正常群の 2 倍量となり、ECS はストレス誘導の IP_3R と RyR の増加を完全に抑制した。ストレスによる海馬ニューロンの活動性低下が生じたと推測すると、そのアップレギュレーションによって Ca^{2+} 濃度の

増加を図るために IP_3R や RyR の量が増えたことが考えられる。なお、メッセンジャーレベルに変化がなかったことから、これらの増加は産生亢進によって増えたのではなく、分解の抑制によるものであると思われる。さらに、 RyR アンタゴニストであるダントロレン投与がこの ECS の効果を完全に抑制した。これらの結果から、ECS が細胞内 Ca^{2+} を増やすことで神経細胞の活性を回復させ、うつ様行動を改善させた可能性がある。しかしながら、この可能性を証明するためにはうつ病モデル及び ECS 処置後の海馬での Ca^{2+} 濃度変化を今後測定する必要がある。

引用文献

- Rosenquist PB et al., J ECT, 30(2);125-131, 2014
 Nakamura-Maruyama E et al., J Physiol Sci, 63(suppl1)S262, 2013
 Steinlein OK., Cell Tissue Res, 357;385-393, 2014
 Takemoto-Kimura S et al., J Neurochem 141;808-818, 2017

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

- ① Nakamura-Maruyama E, Ishikawa R, Himi N, Okabe N, Narita K, Miyazaki T, Aoki S, Miyamoto O. The involvement of ryanodine receptors in depression-like model mouse. The J Physiological Sci, S184, 2018
- ② Shiromoto T, Okabe N, Lu F, Maruyama-Nakamura E, Himi N, Narita K, Yagita Y, Kimura K, Miyamoto O. The role of endogenous neurogenesis in functional recovery and motor map reorganization induced by rehabilitative therapy after stroke in rats. J Stroke Cerebrovas Dis 26;260-272, 2017 (10.1016/j.jstrokecerebrovasdis) (査読有り)
- ③ Himi N, Takahashi H, Okabe N, Nakamura E, Shiromoto T, Narita K, Koga T, Miyamoto O. Exercise in the early stage

after stroke enhances hippocampal BDNF expression and memory function recovery. J Stroke Cerebrovas Dis 25;2987-2994, 2016

(10.1016/j.jstrokecerebrovasdis) (査読有り)

- ④ Maruyama-Nakamura E, Miyamoto O, Okabe N, Himi N, Feng L, Narita K, Keep RF, Yamamoto T, Nakamura T. Ryanodine receptors contribute to the induction of ischemic tolerance. Brain Res Bull 122;45-53, 2016
(10.1016/j.brainresbull.2016.02.018.) (査読有り)

[学会発表](計 4件)

丸山恵美、石川理沙、氷見直之、岡部直彦、成田和彦、宮崎哲治、青木省三、宮本修、「うつ様モデルマウスにおけるリアノジン受容体の関与」、第95回日本生理学会(高松市)、2018年

丸山恵美、石川理沙、氷見直之、岡部直彦、成田和彦、宮崎哲治、青木省三、宮本修、「うつ様モデルマウスにおけるCa²⁺シグナル経路に対するECTの効果：リアノジン受容体の関与」、第47回日本神経精神薬理学会(札幌市)、2017年

丸山恵美、石川理沙、氷見直之、岡部直彦、成田和彦、宮本修、「うつ様モデルマウスにおけるCa²⁺シグナル経路 リアノジン受容体に対するECTの効果」、第94回日本生理学会大会(浜松市)、2017年

氷見直之、岡部直彦、丸山恵美、陸豊、城本高志、高橋尚、成田和彦、古我知成、宮本修、「運動習慣による海馬BDNFの上昇は脳虚血発症による記憶障害を予防する」、第39回日本神経科学大会(横浜市)、2016年

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.kawasaki-m.ac.jp/physiology/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

宮本 修 (MIYAMOTO, Osamu)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：00253287

(2)研究分担者

氷見 直之 (HIMI, Naoyuki)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：70412161

岡部 直彦 (OKABE, Naohiko)

川崎医科大学・医学部・助教

研究者番号：30614276

陸 豊 (Lu, Feng)(平成28年度まで)

川崎医科大学・医学部・助教

研究者番号：20708557

宮崎 哲治 (MIYAZAKI, Tetsuharu)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：50412185

丸山 恵美 (MARUYAMA, Emi)(平成29年度より)

研究者番号：30792072

川崎医科大学・医学部・助教

(3)連携研究者

(4)研究協力者

成田 和彦 (NARITA, Kazuhiko)

城本 高志 (SHIROMOTO, Takashi)