

令和元年5月16日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08270

研究課題名(和文) 抗うつ薬の新規治療標的分子としての脳マトリックスメタロプロテアーゼの機能解析

研究課題名(英文) The role of matrix metalloproteinase in the antidepressant-induced glial cell line-derived neurotrophic factor expression in astrocytes

研究代表者

中島 一恵(久岡一恵)(Nakashima, Kazue)

広島大学・医歯薬保健学研究科(薬)・助教

研究者番号：20393431

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)：本研究では抗うつ薬の新たな治療ターゲットとして、脳グリア細胞のマトリックスメタロプロテアーゼ(matrix metalloproteinase: MMP)に着目した。抗うつ薬がどのサブタイプのMMPに作用し、いかにして制御することで、治療効果と関連する神経栄養因子の産生に寄与するかを明らかにすることを目的として研究を行った。三環系抗うつ薬(アミトリプチリン)がアストロサイトのGi/o共役型リゾフォスファチジン酸(lysophosphatidic acid: LPA)受容体に作用してMMP-9を活性化し、神経栄養因子(GDNFなど)の産生に寄与することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果から、抗うつ薬は従来から知られているモノアミン再取り込み阻害作用に加えて、アストロサイトのLPA受容体に作用しMMP-9を活性化させて、治療効果と関連する神経栄養因子を増加する新規作用を有することを明らかとした。抗うつ薬のLPA受容体とMMP-9に対する薬理作用は、従来から抗うつ薬の作用として知られるモノアミン再取り込み阻害作用とは関連しないことから、新たな創薬ターゲットとしての可能性が期待できることが、本研究結果の学術的意義や社会的意義である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we are intended to elucidate the role of matrix metalloproteinase (MMP) in the mechanism of antidepressants-induced neurotrophic factor production. We demonstrated that a tricyclic antidepressant amitriptyline increased GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor) production through Gi/o coupled lysophosphatidic acid receptor 1 (LPAR1) and MMP-9 activation in astrocytes. The LPAR-MMP-9 mediated antidepressant effect in astrocyte might be contribute to development of novel type of antidepressants.

研究分野：薬理学

キーワード：抗うつ薬 グリア細胞 神経栄養因子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

従来、抗うつ薬はシナプス間隙のモノアミン量を増加することで治療効果を発揮すると考えられてきた。しかしながら、抗うつ薬の投与数時間後に脳内のモノアミン濃度が増加するのに対し、臨床における治療効果発現までには数週間の慢性投与が必要とされ、抗うつ薬の治療効果と関連する真の作用メカニズムは未だ明らかとされていない。近年、脳機能の画像解析研究と死後脳を用いた研究の進歩により、海馬組織の委縮や脳の特定部位におけるグリア細胞の減少などの形態学的異常とうつ病との関係が報告されている。さらに、抗うつ薬が神経およびグリア細胞の新生促進作用や神経栄養因子・成長因子群の増加作用も併せもつことが報告された。したがって、うつ病患者でみられる脳の形態学的異常に対して、抗うつ薬が神経およびグリア細胞新生や神経栄養因子・成長因子群を介して可塑的变化を促す結果、治療効果を発現する可能性が注目されている。そこで、我々は神経栄養因子の産生に關与するメカニズムが治療効果に直結する重要なターゲットとなる可能性に着目し、この治療ターゲットの有用性について検証することはより有効な治療薬開発のために不可欠であると考えた。これまでの研究で我々は、グリア細胞を用いた *in vitro* 系において、抗うつ薬による神経栄養因子増加作用には、マトリックスメタロプロテアーゼ (matrix metalloproteinase: MMP) の活性化が重要であることを明らかにしていた。

MMP は、細胞外マトリックスを分解する亜鉛要求性プロテアーゼ群の総称名であり、現在までに 20 種類以上の MMP サブタイプが報告されている。近年、MMP は関節リウマチやガンだけではなく、てんかんや脳卒中との関連も報告され、脳機能への関与も注目されている。実際に、MMP は中枢神経系において幅広く発現し、神経細胞とグリア細胞の両方に発現が認められる。MMP による細胞外マトリックスの分解は、神経突起の伸長など脳の可塑的变化にも関与し、記憶や情動などの高次脳機能にも重要な役割を果たしている可能性が示唆されている。

一方で、うつ病と MMP の関連性について、うつ病患者の血清中 MMP-9 量がうつ病の重症度と関連していたとの報告がなされている (Yoshida et al., 2012)。また、難治性うつ病の治療に用いられている電気刺激療法をラットに施行すると海馬における MMP-2 と MMP-9 の発現が増加するとの報告がある (Benekareddy et al., 2008)。したがって、うつ病の病態・治療に MMP が関与する可能性が示唆されている。しかしながら、具体的に脳における MMP 機能とうつ病の病態との関連性や重要性については報告がない。また、抗うつ薬がどのサブタイプの MMP をどのようにして活性化させるのか、そして、抗うつ薬の治療効果に対する MMP の重要度や薬理学的意義についても不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、抗うつ薬の新たな治療標的分子として脳アストロサイトの MMP に着目し、モデル動物と培養細胞を用いて、抗うつ薬による MMP 活性化メカニズム、うつ病と MMP 機能の関連性、そして抗うつ薬の治療効果と関連する神経栄養因子の産生における MMP の役割を解明し、MMP の新規治療標的分子としての可能性を明らかにすることを目的として行った。

3. 研究の方法

(1) ラット大脳皮質初代培養アストロサイトの作製: Wistar 系ラット新生仔(生後 1 日)より大脳皮質を摘出し、酵素処理分散法により神経・グリア混合細胞を作製した。約 3 週間培養する間に振盪することによりアストロサイト以外の細胞を取り除き、初代培養アストロサイトを調製した。本研究は広島大学動物実験委員会にて承認を受けている(動物実験許可番号: A16-127)。

- (2) C6 細胞の調製：5%ウシ胎児血清 (fatal bovine serum : FBS) および 2 mM L-グルタミン酸を添加したダルベッコ改変イーグル培地で 37 °C、5% CO₂ / 95% air 条件下にて培養した。継代数が一定範囲内の細胞を実験に用いた。
- (3) 神経障害性疼痛誘発性うつモデルマウスの作製: ddY 系雄性マウス (5 週齢) の坐骨神経を部分結紮することにより神経障害性疼痛誘発性うつモデルマウス (partial sciatic nerve ligation: PSLN 群) を作製した。また、対照群として坐骨神経を露出したのみのマウス (Sham 群) を用いた。動物実験は広島大学動物実験規則を遵守して行い、動物に与える苦痛が最小限となるように配慮した。本研究は広島大学動物実験委員会にて承認を受けている (動物実験許可番号: A15-134)。

4 . 研究成果

- (1) アストログリア細胞 (ラット大脳皮質初代培養アストロサイト、ラットアストログリア由来 C6 細胞) において、三環系抗うつ薬 Amitriptyline 処置による MMP9 の活性増加をザイモグラフィ法により検出した。Amitriptyline 処置で MMP2 の活性は変化しなかった。
- (2) 複数の種類の抗うつ薬 (クロミプラミン、デシプラミン、ミアンセリン、フルオキセチン、フルボキサミン、デュロキセチン) の処置により、アストログリア細胞において MMP9 の活性増加を確認した。一方で、抗うつ作用を持たない中枢神経作用薬 (ハロペリドール、ジアゼパム) やモノアミン (セロトニン、ノルアドレナリン) の処置では MMP9 の活性は変化しなかった。
- (3) Amitriptyline によるグリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) の産生増加作用は MMP9 阻害薬と MMP3 阻害薬で抑制されたが、MMP2 阻害薬では抑制されなかった。
- (4) リコンビナント MMP9 とリコンビナント MMP3 処置により、アストログリア細胞における GDNF の産生が増加した。
- (5) アストログリア細胞において、抗うつ薬による MMP9 の活性化に關与する Gi/o タンパク質の直接的な活性化が神経栄養因子 (BDNF、GDNF) の発現増加を誘導することを薬理学的手法で明らかにした。
- (6) アストログリア細胞において、抗うつ薬による Gi/o タンパク質活性化メカニズムとして Gi/o 共役型リゾフォスファチジン酸 (LPA) 受容体の関与を同定した。
- (7) アストログリア細胞において、ノルアドレナリン作動性・特異的セロトニン作動性抗うつ薬ミルタザピンが神経栄養因子 (BDNF、GDNF) の発現増加を誘導することを薬理学的手法で明らかにした。
- (8) アストログリア細胞において、ミルタザピンによる神経栄養因子の発現を誘導するメカニズムとして、Gi/o 共役型 LPA 受容体と ERK の活性化が関与することを明らかにした。
- (9) 神経障害性疼痛誘発性うつモデルマウスを作製し、うつ病の動物モデルとして表現的構成的妥当性を兼ね備えていることを明らかにした。
- (10) 神経障害性疼痛誘発性うつモデルマウスの前頭前皮質において、MMP9 の機能と関連する炎症性サイトカインの発現増加を確認した。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

- (1) High-mobility group box 1-mediated microglial activation induces anxiodepressive-like behaviors in mice with neuropathic pain.

Kazue Hisaoka-Nakashima, Yoshiaki Tomimura, Toshiki Yoshii, Kazuto Ohata, Naoki Takada, Fang Fang Zhang, Yoki Nakamura, Keyue Liu, Hidenori Wake, Masahiro Nishibori, Yoshihiro Nakata, Norimitsu Morioka

Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2019, 92: 347-362. 査読有
DOI: 10.1016/j.pnpbp.2019.02.005.

- (2) Pharmacological activation Gi/o protein increases glial cell line-derived neurotrophic factor production through fibroblast growth factor receptor and extracellular signal-regulated kinase pathway in primary cultured rat cortical astrocytes

Kazue Hisaoka-Nakashima, Chie Matsumoto, Honami Azuma, Sayaka Taki, Minoru Takebayashi, Yoshihiro Nakata, Norimitsu Morioka

Biol Pharm Bul 2017, 40(10): 1759-1766 査読有
DOI: 10.1248/bpb.b17-00383.

- (3) The expression of glial cell line-derived neurotrophic factor mRNA by antidepressants involves matrix metalloproteinase-9 activation in rat astroglial cells.

Hiromi Abe, Kazue Hisaoka-Nakashima, Naoto Kajitani, Mami Okada-Tsuchioka, Ryoya Yano, Kei Itagaki, Chiyo Shibasaki, Norimitsu Morioka, Yoshihiro Nakata, Minoru Takebayashi

Biochem Biophys Res Commun. 2016, 479(4): 907-912. 査読有
DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.09.070.

〔学会発表〕(計7件)

- (1) ラット大脳皮質初代培養アストロサイトにおいてミルタザピンは GDNF 産生を増加する
高城 冴花、中島 一恵、渡辺 慎太郎、中村 庸輝、仲田 義啓、森岡 徳光
第 57 回日本薬学会・日本病院薬剤師会・中国四国支部学術大会 2018 年 11 月 10 日(米子市)

- (2) The analysis of anxiety- and depression-related behaviors in neuropathic pain of mice - possible involvement of brain inflammation

Kazue Hisaoka-Nakashima, Yoshiaki Tomimura, Toshiki Yoshii, Fang Fang Zhang, Yoki Nakamura, Keyue Liu, Masahiro Nishibori, Yoshihiro Nakata, Norimitsu Morioka

第 91 回日本薬理学会年会 開催日 2017.7.1~6

The 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WCP2018)

- (3) 神経障害性疼痛モデルマウスにおけるうつ様行動と脳ミクログリア機能解析

中島 一恵、富村 昌暉、吉井 稔紀、張 芳芳、仲田 義啓、森岡 徳光

第 39 回日本生物学的精神医学会・第 47 回日本神経精神薬理学会 合同年会 2017 年 9 月 28 日~30 日(札幌市)

- (4) ラット初代培養アストロサイトにおいてリゾフォスファチジン酸がトロンボスポンジン 1 発現に与える効果の検討

横江 俊樹、中島 一恵、東 穂奈美、高城 冴花、仲田 義啓、森岡 徳光

第 55 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会 2016 年 11 月 5-6 日(岡山市)

- (5) Antidepressant amitriptyline activates matrix metalloproteinase in astroglial cells: involvement in glial cell line-derived neurotrophic factor expression.

Hiromi ABE, Kazue HISAOKA-NAKASHIMA, Naoto KAJITANI, Mami OKADA-TSUCHIOKA, Kei ITAGAKI,

Chiyo SHIBASAKI, Morimitsu MORIOKA, Yoshihiro NAKATA, Minoru TAKEBAYASHI
30th CINP WORLD CONGRESS OF NEUROPSYCHOPHARMACOLOGY 2016.07.03-05, Seoul, Korea

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/pha/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：森岡 徳光

ローマ字氏名：Morioka Norimitsu

所属研究機関名：広島大学

部局名：医歯薬保健学研究科(薬)

職名：教授

研究者番号(8桁)：20346505

研究分担者氏名：仲田 義啓

ローマ字氏名：Nakata Yoshihiro

所属研究機関名：広島大学

部局名：医歯薬保健学研究科(薬)

職名：名誉教授

研究者番号(8桁)：40133152

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。