

令和 4 年 4 月 20 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18234

研究課題名(和文) 高齢期における抗不安薬ジアゼパム長期使用による認知機能障害の発生メカニズム解明

研究課題名(英文) Impaired Cognitive Function Following Chronic Diazepam Treatment in Middle-Aged Mice

研究代表者

古川 智範 (Furukawa, Tomonori)

弘前大学・医学研究科・助教

研究者番号：60402369

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：抗不安薬として高齢者に処方されるジアゼパム(ベンゾジアゼピン系薬剤)を長期的に使用することによる認知機能低下が問題となっている。そこで本研究では、ジアゼパムを長期投与した高齢マウスを用いて、記憶学習能力に関わる海馬領域の神経細胞の細胞死や神経新生、神経細胞の形態変化、神経回路機能などを解析した。その結果、細胞死や神経新生にはジアゼパム長期投与による変動はなかったが、高齢マウスでは加齢による神経機能が減弱すると共に、ジアゼパム投与により神経細胞の形態変化および神経回路機能の減弱が認められた。さらに、それらのジアゼパムによる影響は、長期的な運動の負荷によって予防できることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果は、長期的なジアゼパム使用によって生じる認知機能低下が海馬領域における神経細胞の新生や細胞死ではなく、形態的特徴の変化による機能的減退によって引き起こされることを示唆するものであり、ジアゼパムの中枢神経系における詳細な分子的作用機序解明への発展が期待できる。運動による認知機能向上は以前から注目されており、近年、末梢血中の運動由来分子が同定され、詳細な研究が期待されている。本研究結果は、運動由来分子の中枢における機能的特性の解明に貢献できると考えられる。運動由来分子の機能的特性が明らかになれば、ジアゼパム等による認知機能減退の予防法や治療法への発展が期待できる。

研究成果の概要(英文)：It has been reported that long-term benzodiazepine administration induces cognitive decline in older adults, which provides evidence for toxicity. In this study, we investigated the mechanism of cognitive decline due to long-term use of diazepam, a benzodiazepine, and the preventive effect of exercise for the adverse effect of diazepam. In hippocampal region of chronically diazepam administered middle-aged mice, we analyzed apoptosis, neurogenesis, morphological changes in pyramidal neurons and neural circuit function. There were no effects of chronic diazepam on cell death or neurogenesis, but spine density of pyramidal neurons was decreased and long-term potentiation of CA1 and CA3 were attenuated by both diazepam administration and aging. Furthermore, it was found that the adverse effects of diazepam can be prevented by long-term exercise by force-running wheel.

研究分野：神経生理学

キーワード：ベンゾジアゼピン ジアゼパム 認知機能 海馬LTP 運動

### 1. 研究開始当初の背景

中枢神経回路における抑制性神経伝達物質であるガンマアミノ酪酸 (GABA) は、認知、学習、情動などの高次脳機能に強く関わることが知られている。GABA による抑制性情報伝達に障害が生じると、てんかん・不安症・うつ病・統合失調症・自閉症などの精神疾患が発症すると考えられている。これらの精神疾患治療薬として使用されるベンゾジアゼピン (BZ)系薬剤は、GABA<sub>A</sub> 受容体に結合し、GABA による抑制性神経伝達を亢進させることで、鎮静、睡眠誘導、抗不安、抗痙攣などの効果を示す。一方で、高齢者における BZ 系薬剤の長期的な使用は、薬剤耐性や依存症、離脱症、認知症発症リスクの増加などの弊害をもたらすことが報告されており、深刻な問題となっている。しかしながら、中枢神経系の長期的な BZ 暴露により認知機能が低下するメカニズムはほとんど解明されておらず、細胞レベルおよび組織レベルにおける基礎的な研究が期待されている。申請者はこれまでに、ベンゾジアゼピン (BZ)系薬剤であるジアゼパム (DZP) を慢性的に投与したマウスを用いてモリス水迷路を用いた認知機能行動評価を行い、DZP 長期投与した老齢マウスにおいて認知機能が低下することを確認した。そして、記憶に関わる海馬領域において、神経活動性の制御に関わる興奮性シナプスが存在する棘状の構造 (スパイン) の密度を解析するとともに、スパイン密度と密接に関与する海馬 CA1 領域の長期増強 (LTP: long term potentiation) の解析を行った。その結果、DZP 慢性投与によりスパイン密度は老齢・若齢ともに減少し、LTP は若齢マウスにおいてのみ減少していた。さらに、老齢および若齢マウスのコントロール群 (DZP 非投与群) におけるスパイン密度および LTP を比較した結果、いずれも加齢に伴って減少・減弱していた。これらの結果は、中枢神経回路における生理的機能や組織的構造は加齢に伴って変遷し、老齢マウスの中枢神経系は認知機能の低下が行動に現れやすい状態となっている可能性を示唆している。さらに、申請者はマイクロアレイ法を用いて DZP 慢性投与マウス脳組織における転写産物の発現量を網羅的に解析し、Lcn2 が増加していることを見出して報告している。Lcn2 は神経細胞の活動に対して抑制的に作用し、スパインを減少させ、神経細胞新生を抑制することが報告されるとともに (Mucha et al., 2011; Ferreira et al., 2017)、神経傷害性を示すタンパク質として注目されている (Naude et al., 2012; Kim et al., 2016)。

### 2. 研究の目的

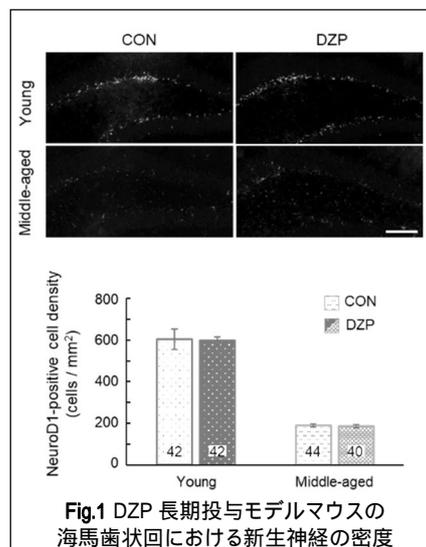
本課題では、DZP によって発現増加し分泌された Lcn2 が神経細胞新生の抑制やスパイン密度の減少を引き起こすことで老齢マウスにおける認知機能低下が起こると仮説を立て、これを立証することを目的とする。また、DZP による Lcn2 発現の調節機構や、近年注目されつつある運動による認知機能改善効果に着目し、DZP 長期投与による海馬神経機能の減弱を緩和できるか検討する。

### 3. 研究の方法

マウスは 8~10 週齢 (若齢) および 54~58 週齢 (老齢) のマウスを用いた。BZD の長期投与は、BZD 系薬剤である DZP を注入した浸透圧ポンプ (DURECT Corporation, Cupertino, CA, United States) をマウス腹腔内に留置することにより行った。DZP 投与開始から 4 週間後において組織学的・生理学的解析を行った。興奮性シナプス構造であるスパインは、4%パラフォルムアルデヒドで固定したマウス脳組織切片を作成後に海馬 CA1 および CA3 領域の錐体細胞にルシファーイエローを注入して可視化し、レーザー共焦点顕微鏡により観察を行った。神経回路機能の評価として多電極記録装置を用いて海馬 CA1 領域および CA3 領域の LTP を解析した。海馬における細胞死および細胞新生の評価は、TUNEL 染色および新生神経細胞のマーカーである NeuroD1 を免疫組織学的に染色して評価した。運動負荷は DZP 投与前の 12 週間、強制回転カゴ (FWS-1505; Melquest Ltd., Toyama, Japan) を用いて行った。DZP による Lcn2 の発現調節機構を調べるため、レポータージーンアッセイを行った。

### 4. 研究成果

まず DZP 長期投与マウスの海馬における細胞死および神経新生について、組織学的解析を行った。その結果、DZP 投与老齢マウスにおいても細胞死は検出されなかったことから、加齢や DZP 長期投与が細胞死を著しく増加させるわけではないことがわかった。また、NeuroD1 陽性細胞は加齢に伴う減少が認められたが、長期 DZP 投与による影響は認められず、神経新生への DZP の影響も少ないことが示唆された (Fig.1)。



DZP 慢性投与マウスの海馬 CA1 および CA3 における LTP を解析することにより、認知機能に関わる海馬の神経回路機能を評価した。若齢マウスにおいては CA1 および CA3 領域において DZP 長期投与による LTP の減弱が認められた。老齢マウスにおいても DZP 長期投与によって減弱傾向を示したが、CA3 にのみ DZP による有意な減弱が認められた (Fig.2)。また、加齢に伴う LTP の有意な減弱も認められた。これらの結果から、加齢および DZP 長期投与いずれも海馬 LTP を減弱させることが示唆された。海馬 CA1 領域および CA3 領域において、興奮性シナプス構造のスパインを解析した結果、若齢マウスでは CA3 領域において、老齢マウスでは CA1、CA3 両領域において DZP 長期投与によるスパイン密度の減少が認められた (Fig.3)。また、CA1 領域においては、加齢に伴うスパイン密度の有意な減少が認められた。これらの結果から、CA1 領域では加齢および DZP によってスパイン密度が減少し、CA3 領域では老齢マウスの方が DZP の影響を受けやすいことが示唆された。

次に、海馬 LTP およびスパイン密度の減弱・減少が、強制運動負荷によって緩和されるか検討した。12 週間の強制運動を負荷させたマウスには、DZP の長期投与による LTP の減弱やスパイン密度の減少が認められなかった (Fig.4, 5)。この結果から、運動負荷により、DZP に由来する神経機能の減退を予防できることがわかった。

DZP 投与によって増加する

Lcn2 の発現調節について、レポーター遺伝子アッセイを行った結果、Pax2、Atoh1、Neurog1 の3つが調節因子である可能性が示唆された。さらに、これらの DZP 応答配列が Lcn2 転写を亢進させることを、GABA 受容体が発現していない培養細胞系を用いて確認した。

これらの成果から、DZP の長期投与は海馬神経のスパイン密度を減少させ海馬神経回路機能を減弱させることで認知機能が低下すると考えられる。しかしながら、これらの現象を引き起こす分子的なメカニズムや、DZP が発現増加させる Lcn2 の機能性についてはさらなる研究が必要である。また、運動負荷が DZP の影響を軽減させたことから、DZP 投与前の長期的な運動は、DZP 由来の認知機能低下を予防する効果があると考えられる。近年、認知機能に関わる運動由来分子がいくつか同定され、その有用性が注目されつつある。今後は、運動由来分子が認知機能を向上させる詳細なメカニズムについて追及していきたい。

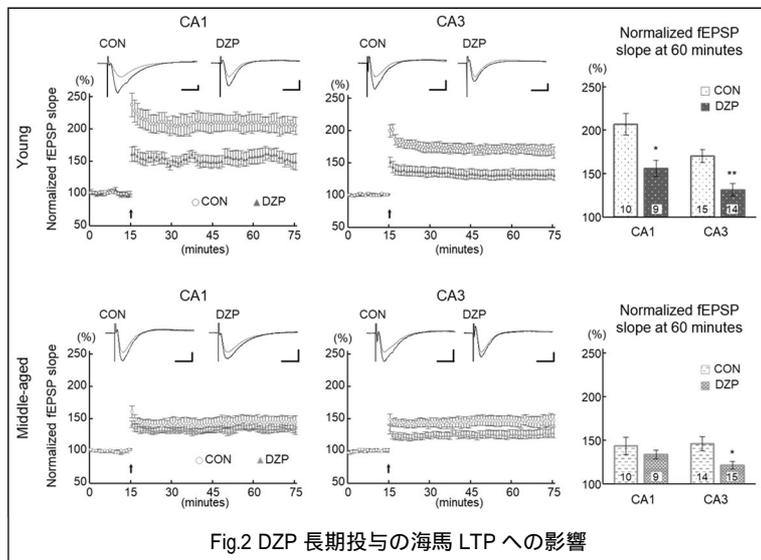


Fig.2 DZP 長期投与の海馬 LTP への影響

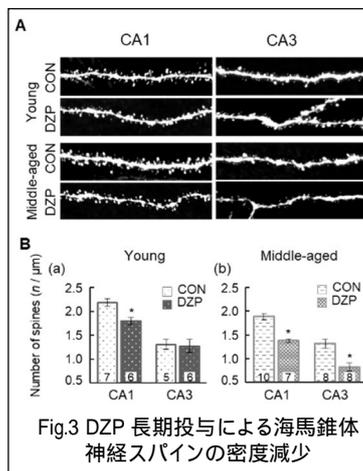


Fig.3 DZP 長期投与による海馬錐体神経スパインの密度減少

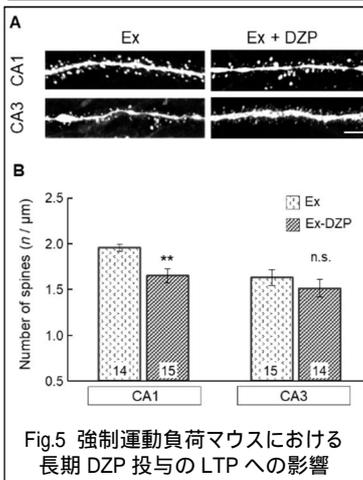


Fig.5 強制運動負荷マウスにおける長期 DZP 投与の LTP への影響

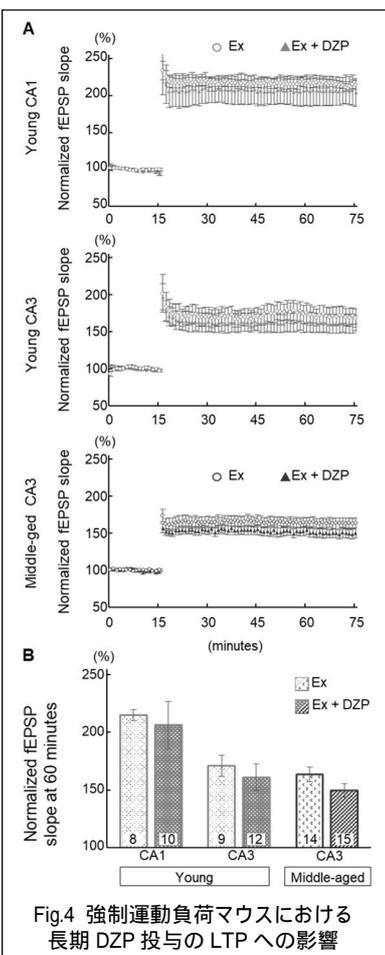


Fig.4 強制運動負荷マウスにおける長期 DZP 投与の LTP への影響

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Sakamoto Yui, Shimoyama Shuji, Furukawa Tomonori, Adachi Masaki, Takahashi Michio, Mikami Tamaki, Kuribayashi Michito, Osato Ayako, Tsushima Daiki, Saito Manabu, Ueno Shinya, Nakamura Kazuhiko	4. 巻 Publish Ahead of Print
2. 論文標題 Copy number variations in Japanese children with autism spectrum disorder	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Psychiatric Genetics	6. 最初と最後の頁 276
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/ypg.0000000000000276	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shimoyama Shuji, Furukawa Tomonori, Ogata Yoshiki, Nikaido Yoshikazu, Koga Kohei, Sakamoto Yui, Ueno Shinya, Nakamura Kazuhiko	4. 巻 14
2. 論文標題 Lipopolysaccharide induces mouse translocator protein (18 kDa) expression via the AP-1 complex in the microglial cell line, BV-2	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0222861
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0222861	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Furukawa Tomonori, Nikaido Yoshikazu, Ogata Yohiski, Kushikata Tetsuya, Hirota Kazuhoshi, Kanematsu Takashi, Hirata Masato, Ueno Shinya	4. 巻 33
2. 論文標題 Phospholipase C-related inactive protein type-1 deficiency affects anesthetic electroencephalogram activity induced by propofol and etomidate in mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Anesth	6. 最初と最後の頁 531-542
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00540-019-02663-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Furukawa Tomonori, Nikaido Yoshikazu, Shimoyama Shuji, Masuyama Nozomu, Notoya Ayaka, Ueno Shinya	4. 巻 13
2. 論文標題 Impaired Cognitive Function and Hippocampal Changes Following Chronic Diazepam Treatment in Middle-Aged Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Aging Neuroscience	6. 最初と最後の頁 777404
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnagi.2021.777404	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shiro Tochitani, Tomonori Furukawa, Ryo Bando, Shigeaki Kondo, Takashi Ito, Yoshitaka Matsushima, Toshio Kojima, Hideo Matsuzaki, Atsuo Fukuda	4. 巻 31
2. 論文標題 GABAA Receptors and Maternally Derived Taurine Regulate the Temporal Specification of Progenitors of Excitatory Glutamatergic Neurons in the Mouse Developing Cortex	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cerebral Cortex	6. 最初と最後の頁 4554-4575
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/cercor/bhab106	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nikaido Yoshikazu, Midorikawa Yoko, Furukawa Tomonori, Shimoyama Shuji, Takekawa Daiki, Kitayama Masato, Ueno Shinya, Kushikata Tetsuya, Hirota Kazuyoshi	4. 巻 12
2. 論文標題 The role of neutrophil gelatinase-associated lipocalin and iron homeostasis in object recognition impairment in aged sepsis-survivor rats	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 249
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-03981-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 藤井萌加、下山修司、古川智範、上野伸哉
2. 発表標題 GABAA受容体の細胞内分布における 3サブユニットのリン酸化の影響
3. 学会等名 東北談話会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 増山望、古川智範、二階堂義和、下山修司、能登谷綾香、上野伸哉
2. 発表標題 ジアゼパム長期使用による海馬神経機能への影響
3. 学会等名 東北談話会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Furukawa Tomonori, Nikaido Yoshikazu, Shuji Shimoyama, Ogata Yohiski, Ueno Shinya
2. 発表標題 Chronic diazepam administration impaired hippocampal CA3 LTP and spine morphology in aged mice
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Furukawa Tomonori, Nikaido Yoshikazu, Shimoyama Shuji, Ogata Yoshiki, Ueno Shinya
2. 発表標題 The effect of chronic diazepam administration on cognitive function in aged mice.
3. 学会等名 The 43rd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 古川 智範、二階堂 義和、下山 修司、上野 伸哉
2. 発表標題 抗不安薬ジアゼパムの長期使用による海馬神経機能への影響
3. 学会等名 第47回日本脳科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Furukawa Tomonori, Nikaido Yoshikazu, Shimoyama Shuji, Ueno Shinya
2. 発表標題 The effect of chronic diazepam administration on hippocampus of aged mice.
3. 学会等名 the 98th Annual Meeting of The Physiological Society of Japan
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Furukawa Tomonori, Nikaido Yoshikazu, Ogata Yohiski, Kushikata Tetsuya, Hirota Kazuhoshi, Kanematsu Takashi, Hirata Masato, Ueno Shinya
2. 発表標題 Phospholipase C-related inactive protein type-1 deficiency affects anesthetic electroencephalogram activity induced by propofol and etomidate in mice
3. 学会等名 Hirosaki Medical Forum
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	下山 修司  (Shuji Shimoyama)		
研究協力者	二階堂 義和  (Nikaido Yoshikazu)		
研究協力者	上野 伸哉  (Ueno Shinya)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------