

機関番号：13401

研究種目：若手研究 (B)

研究機関：2009～2010

課題番号：21791121

研究課題名 (和文) バルプロ酸の薬理作用と脳内代謝機能に及ぼす影響に関する研究

研究課題名 (英文) The pharmaceutical action and the effect against brain metabolic function of valproate

研究代表者

小俣 直人 (OMATA NAOTO)

福井大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：30334832

研究成果の概要 (和文) : バルプロ酸の臨床作用機序を、バルプロ酸の glycogen synthase kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) に対する阻害作用に注目して検討した。実験動物の海馬歯状回における GSK3 $\beta$  の発現を抑制したところ、強制水泳試験および尾懸垂試験において抗うつ様効果観察された。従って、バルプロ酸の GSK3 $\beta$  阻害作用が、バルプロ酸の臨床作用機序と関係している可能性が示唆された。次に、バルプロ酸の中樞神経系における副作用の発症機序を、脳ミトコンドリア機能への直接的な影響に注目して検討した。実験動物の脳切片にバルプロ酸を投与すると、ミトコンドリア機能は低下した。従って、バルプロ酸はミトコンドリアを傷害して中樞神経系副作用を引き起こす可能性があることが示唆された。

研究成果の概要 (英文) : The mechanism of clinical action of valproate was investigated through its inhibitory action against glycogen synthase kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ). Inhibition of GSK3 $\beta$  in the hippocampal dentate gyrus of experimental animal revealed the antidepressive effect in the forced swim test and tail suspension test. Therefore, the inhibitory action of valproate against GSK3 $\beta$  might contribute to the mechanism of its clinical action. Next, the mechanism of the side effect induction of valproate in the central nervous system was investigated through its direct effect against the brain mitochondrial function. In the experiment using brain slices made from experimental animals, valproate decreased the mitochondrial function. Therefore, the inhibition of the mitochondrial function by valproate might contribute to its side effect in the central nervous system.

交付決定額

(金額単位：円)

|         | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2009 年度 | 1,900,000 | 570,000 | 2,470,000 |
| 2010 年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 年度      |           |         |           |
| 年度      |           |         |           |
| 年度      |           |         |           |
| 総計      | 3,200,000 | 960,000 | 4,160,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：気分安定薬、GSK3 $\beta$ 、歯状回、抗うつ効果、神経毒性、グルコース代謝、ミトコンドリア機能、ポジトロン

## 1. 研究開始当初の背景

(1) バルプロ酸は元来抗てんかん薬として使用されてきたが、近年では気分安定化作用が注目され、躁うつ病などの精神疾患の治療に広く用いられている。その作用機序として近年、glycogen synthase kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ )の阻害効果が注目されるようになった。しかし、GSK3 $\beta$ 抑制効果がうつに対して脳組織全体に均一に作用しているとは考えにくい一方、GSK3 $\beta$ 阻害の抗うつ効果に関する部位特異性は検討されていない。また、リチウムが臨床効果を発揮するには持続的な投与が必要であり、GSK3 $\beta$ においてもその持続的な抑制効果が評価されるべきである。更に、阻害剤のGSK3 $\beta$ に対する特異性は十分ではなく、GSK3 $\beta$ 抑制と抗うつ効果の関係はいまだ不明確である。

(2) 一方、バルプロ酸による中枢神経系の副作用として、Reye症候群などの代謝性脳症やパーキンソン症候群が報告されている。そのメカニズムとして、代謝活動を担う脳内のミトコンドリアが直接的に傷害される可能性が指摘されているが、実際どのような機序で、脳細胞のミトコンドリアを傷害するのかは不明である。肝臓ではバルプロ酸が脂肪酸の分解( $\beta$ 酸化)によってアシルCoA体であるバルプロイルCoAに変わり、このバルプロイルCoAがミトコンドリアに対して毒性に働き、ミトコンドリアのさまざまな酵素活性が阻害されると考えられている。しかし、脳ではバルプロイルCoAは検出されなかったとの報告もあり、脳内でもバルプロイルCoAの蓄積が脳細胞のミトコンドリア機能低下を引き起こすのかどうかは不明である。

## 2. 研究の目的

(1) 気分安定薬としてのバルプロ酸の臨床作用機序を、GSK3 $\beta$ に対する阻害作用に注目して解明していく。

(2) バルプロ酸の中枢神経系における副作用の発症機序を、脳内代謝活動への直接的な影響に注目して解明していく。

## 3. 研究の方法

### (1) バルプロ酸の臨床作用機序の解明

RNAiは二本鎖RNAによって配列特異的に遺伝子の発現が抑制される現象であり、short hairpin RNAを発現するレンチウイルスベクターを用いれば、脳の特定の部位において神経細胞など非分裂細胞にも持続的な *in vivo* RNAi 導入が可能となる。うつとの関係で注目されている脳部位の一つとして海馬歯状回があげられる。そこで今回、レンチウイルスベクターを用いた *in vivo* RNAi による歯状

回 GSK3 $\beta$  抑制の抗うつ様効果を検討した。GSK3 $\beta$  shRNA plasmid を HEK293T/17 細胞にトランスフェクションし、回収した培地を超遠心して濃縮ウイルス液を作成した。8 週齢の雄性 CD-1 マウスを麻酔して脳定位固定装置に固定し、濃縮ウイルス液を両側歯状回に注射した(抗 GSK3 $\beta$  マウス)。7 日間の回復期間の後、1 日 2 時間の拘束ストレスを 14 日間負荷してうつ病モデル動物を作成し、オープンフィールド試験、強制水泳試験および尾懸垂試験による行動解析を実施した。その後、ウェスタンブロッティング法および免疫組織化学法を用いて GSK3 $\beta$  の発現抑制を確認した。

### (2) バルプロ酸の副作用発症機序の解明

研究代表者らは、ポジトロン標識化合物である [ $^{18}$ F]2-fluoro-2-deoxy-D-glucose ([ $^{18}$ F]FDG) をグルコース代謝のトレーサーとして、神経機能を維持しているラット脳切片におけるグルコース代謝を動的な 2 次元画像情報として描出できる新しい機能解析法(dynamic positron autoradiography technique, dPAT)に着手してきた。PET やオートラジオグラフィ法を用いた *in vivo* での計測とは異なり、脳切片を用いた dPAT の実験系(循環動態や末梢組織代謝などを有さない)では、バルプロ酸による脳組織のグルコース代謝への直接的な作用を、灌流液や薬剤負荷の条件を任意に制御しながら定量評価することが可能である。そこで、ラット脳切片に対して dPAT を用いた [ $^{18}$ F]FDG 取り込み実験およびテトラゾリウム塩 WST-1 を用いた比色分析法によるミトコンドリア機能の測定を行い、バルプロ酸による脳内代謝活動(グルコース代謝、ミトコンドリア機能)への直接的な影響について評価した。

## 4. 研究成果

### (1) バルプロ酸の臨床作用機序の解明

#### ① GSK3 $\beta$ の発現抑制

実験動物より海馬を切り出し、GSK3 $\beta$  を標的にウェスタンブロッティング法を施行した。抗 GSK3 $\beta$  マウスの海馬における GSK3 $\beta$  発現は、scrambled shRNA plasmid を用いた control マウスの約 70%と、有意に低下していた(図 1)。免疫組織化学法では、特に歯状回顆粒細胞下層での GSK3 $\beta$  発現低下が認められた。



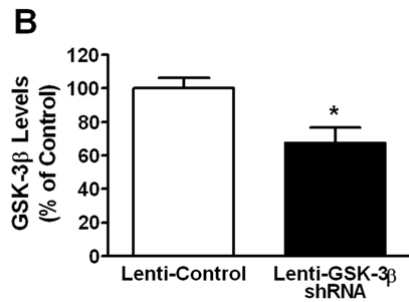


図1 RNAiによるGSK3β発現抑制  
ウェスタンブロッティング(A)およびその  
定量結果(B)

GAPDH : glyceraldehyde-3-phosphate  
dehydrogenase, positive control

\* $p < 0.05$  compared to the control.

## ② GSK-3β抑制の抗うつ様効果

オープンフィールド試験では両者の活動量に有意な差は無かったものの、強制水泳試験および尾懸垂試験では抗GSK-3βマウスの無動時間はcontrolマウスと比べて有意に短縮していた(図2)。

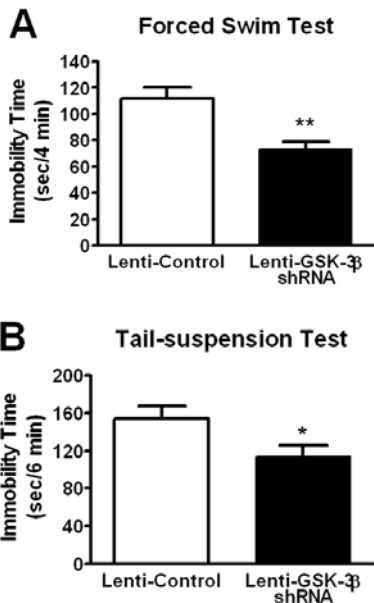


図2 行動解析

A : 強制水泳試験における無動時間

B : 尾懸垂試験における無動時間

以上より、海馬歯状回におけるGSK-3βの持続的な抑制が、抗うつ様効果を発揮することが示唆され、この効果が臨床におけるバルプロ酸の気分安定薬としての作用機序と関係している可能性が示唆された。

## (2) バルプロ酸の副作用発症機序の解明

### ① グルコース代謝への影響

ラットより矢状断脳切片を作成し、 $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ を用いたdPATを施行した。10 mM以上のバルプロ酸を投与した場合、対照群に比べ $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ 取り込みが増加した(図3)。

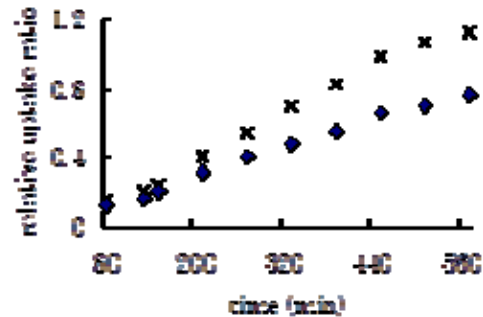


図3 グルコース代謝への影響

◆ コントロール群

× バルプロ酸投与群

### ② ミトコンドリア機能への影響

テトラゾリウム塩WST-1は、ミトコンドリアの呼吸鎖に属する脱水素酵素(succinate-tetrazolium reductase システム)により還元され、水溶性ホルマザン色素を生じる。この発色を比色定量することにより、バルプロ酸による脳切片のミトコンドリア機能の変化を測定した。dPATと同一の灌流装置を用いてバルプロ酸およびWST-1を含む灌流液で脳切片をインキュベートし、組織中の発色を分光光度計で測定した。その結果、30 mM以上のバルプロ酸を投与した場合、ミトコンドリア機能が対照群に比べて有意に低下した。

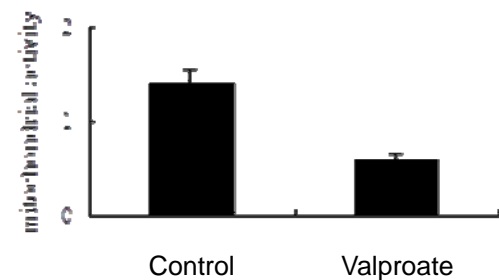


図4 ミトコンドリア機能への影響

以上より、バルプロ酸によりミトコンドリアでの好氣的糖代謝が低下したため、代償的に嫌氣的糖代謝が亢進したと考えられた。これら脳内代謝活動の変化が、バルプロ酸の作用機序および中枢神経系副作用(Reye症候群などの代謝性脳症やパーキンソン症候群など)の発症機序に何らかの形で関与することが想定された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

- ① 小俣直人、Chiu Chi-tso、Moya Pablo、Leng Yan、Wang Zhifei、Hunsberger Joshua、Leeds Peter、Chuang De-Maw ; Lentivirally mediated GSK-3beta silencing in the hippocampal dentate gyrus induces antidepressant-like effects in stressed mice、Int J Neuropsychopharmacol、査読有、7 巻、2010、1-7
- ② 小俣直人 ; なぜ気分安定薬は効くのか? -分子メカニズムの解明を目指して-、北陸神経精神医学雑誌、査読無、23 巻、2009、18-25

[学会発表] (計3件)

- ① 小俣直人、村田哲人、丸岡伸行、三屋博宣、Chiu Chi-tso、Moya Pablo、Leng Yan、Wang Zhifei、Hunsberger Joshua、Leeds Peter、藤林靖久、和田有司、Chuang De-Maw ; 気分安定薬の作用機序から見た気分障害の病態生理、131 年会日本薬学会 一般シンポジウム、2011年3月29日、静岡
- ② 小俣直人、成田耕介、村田哲人、和田有司 ; Increase of plasma adiponectin by fluvoxamine、International Conference on Brain Function and Development (Fukui-2010)、2010年1月25日-26日、福井
- ③ 小俣直人、Moya Pablo、Leng Yan、Chiu Chi-tso、Wang Zhifei、Leeds Peter、Chuang De-Maw ; Antidepressant-like effects of GSK-3 $\beta$  inhibition in the mouse dentate gyrus using lentiviral-mediated RNAi. Neuroscience 2009、2009年10月21日、Chicago (USA)

[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

<http://www.med.u-fukui.ac.jp/SEISIN/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小俣 直人 (OMATA NAOTO)

福井大学・医学部附属病院・講師

研究者番号 : 30334832