

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590126

研究課題名(和文) 治療抵抗性うつ病改善を目標としたGLP-2の薬理学的基盤研究

研究課題名(英文) Pharmacological research on antidepressant-like effects of GLP-2 on refractory depression.

研究代表者

岡 淳一郎(OKA, Jun-ichiro)

東京理科大学・薬学部・教授

研究者番号：40134613

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：視床下部-下垂体-副腎皮質(HPA)系持続的過活動はストレス脆弱性を惹起し、治療抵抗性うつ病を生じるが、GLP-2はこのモデルマウスで視床下部からのCRH放出抑制、及び海馬歯状回神経新生促進効果による抗うつ様作用を示した。ヒトでも適用できるように経鼻投与に適した構造を付加した経鼻投与用GLP-2誘導体は、中枢移行して治療抵抗性モデルマウスでも抗うつ様作用を示した。

また、GLP-2に学習改善作用と抗不安作用があること、及びHPA系亢進が大きく関与する高血圧モデルラットでの降圧作用機序も明らかにした。

HPA系の調節作用を有するGLP-2は、既存薬とは異なる新たな治療薬となる可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：Abnormalities in the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA)-axis have been thought to induce refractory depression. Glucagon-like peptide-2 (GLP-2) exhibited antidepressant-like effects in ACTH-treated imipramine-resistant depression model mice through an inhibition on the release of CRH from the PVN in the hypothalamus and the restoration of neurogenesis in the SGZ of the hippocampal dentate gyrus. Intranasal administration of the newly synthesized GLP-2 derivative also showed antidepressant-like effects in ACTH-treated mice, indicating a possible clinical treatment for major depression. Furthermore, we showed memory improving effects and anxiolytic effects of GLP-2 in mice, as well as the hypotensive effects in hypertension model rats.

研究分野：医学・薬学・薬理系薬学・神経科学

キーワード：うつ病 高血圧 GLP-2 ストレス 経鼻投与

1. 研究開始当初の背景

(1) うつ病は、社会的にも大きな問題となっている疾患の一つである。WHOの疫学調査によると、うつ病の有病率は7位に位置し、更に2020年には2位になると予想されている^①。日本においても、うつ病の有病率は男性で約2~3%、女性で約5~10%であり、そのうち自殺を考えるものが60%に及び、自殺原因の中で1位といわれており、うつ病を「死に至る病」としても認識してその対策が喫緊の課題となっている。

うつ病は様々な要因が原因の複雑な疾患であるが、うつ的な素因をもつ患者に肉体的・精神的なストレス刺激が加わった結果うつ状態が出現するという原因も考えられている。ストレス刺激は最終的に視床下部に集められ、その後の内分泌系の応答反応として視床下部-下垂体-副腎皮質 (hypothalamic-pituitary- adrenocortical: HPA) 系が亢進することが知られている。視床下部では室傍核からのコルチコトロピン放出ホルモン (CRH) が放出され、下垂体前葉からの副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) 放出を規定し、最終的に副腎皮質からの糖質コルチコイド分泌レベルを調節する。糖質コルチコイドは、海馬や前頭葉、扁桃体に存在する glucocorticoid receptor (GR) を介して、HPA系にネガティブフィードバックをかける。

現在のうつ病治療の問題点としては、抗うつ薬投与から効果が現れるまで1~3週間以上かかり、完治するまでには6ヶ月の投薬が必要であること、投与初期に副作用(口渇、便秘、排尿障害)が出ることもある他に、抗うつ薬の効果が現れない患者がいる事が挙げられる。

(2) 申請者らは、種々の神経ペプチド関連化合物が脳機能障害を改善することを報告してきた^{②,③,④}。Glucagon-like peptide-2 (GLP-2)は、プログルカゴンからGLP-1と同時に産生される33個のアミノ酸からなるペプチ

ドホルモンである。小腸、大腸では、クリプト細胞の増殖やアポトーシスの抑制を介して粘膜上皮細胞の増殖を促進し^{⑤,⑥}、欧米で短腸症候群の治療薬として用いられている。申請者らは脳での機能について研究を続けており、GLP-2がマウスで抗うつ様作用を示すことを報告した^⑦。また、マウスに強制水泳法でストレスを負荷した際に、ストレス反応で上昇する血中糖質コルチコイド量をGLP-2が抑える事も見出し^⑧、GLP-2はHPA系の亢進を抑える作用を有していることを示唆している。

2. 研究の目的

本研究では、抗うつ薬治療に抵抗性がある患者がいるという問題点に焦点を当て、ストレスによるHPA系の過剰亢進がその重要因子であり、HPA系の亢進を抑制するGLP-2が治療抵抗性うつ病や高血圧に対して有効なのではないかという仮説の下に研究を遂行する。

ストレス脆弱性・HPA系亢進モデル動物を用い、GLP-2の抗うつ様作用及び降圧作用を確認した後、脳内モノアミン含量の変化、HPA系関連脳内部位の神経活動変化、血中コルチコステロン量、海馬、前頭葉、扁桃体のGR発現量、うつ病時に生じる高血圧症状への効果と作用機序、うつ病態の発症に重要な関与をすると考えられる海馬におけるBDNF mRNA量、シナプス可塑性と神経可塑性(形態変化、神経新生等)について検討する。この結果、HPA系の起点である視床下部室傍核 (PVN)、及び交感神経活性化と関連する延髄孤束核 (NTS) への影響を明らかとし、さらに情動形成に深く係る海馬での作用を解明して、従来のセロトニン・ノルアドレナリンを標的とした治療薬ではない新規メカニズムを有するGLP-2を用いた治療戦略を構築することを目的とする。

さらに、GLP-2はペプチドであるため、これまでの動物実験では直接脳内に注入する脳室内投与方法を用いたが、臨床では使用できないため、末梢投与で分解を受けずに脳内に

移行させる方法を考案する必要がある。分子量の大きい化合物を脳内移行させる手段として、経鼻投与法が近年注目されており、本研究では経鼻投与様に GLP-2 を製剤化してその中枢移行と抗うつ様作用を調べ、臨床への橋渡し研究を遂行する。

3. 研究の方法

(1) 視床下部-下垂体-副腎皮質(HPA)系亢進状態を維持させるため、マウスに副腎皮質刺激ホルモン(ACTH: $0.45 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$)を 14 日間投与して治療抵抗性うつ病マウスとした。強制水泳試験後にホルマリン灌流固定して凍結脳切片標本を作製し、神経活動の指標となる c-Fos タンパク質発現を免疫組織化学的手法により検出した⁹⁾。

(2) 海馬歯状回顆粒細胞層下帯(SGZ)での神経新生を調べるため、(1)の後に凍結海馬切片標本を作製し、Ki67 抗体で増殖細胞数を、doublecortin (DCX)抗体で未成熟神経前駆細胞数を免疫組織化学的手法で検出した⁹⁾。

(3) うつ病時に生じる高血圧症状への GLP-2 の降圧作用機序を解明する目的で、合成副腎皮質ホルモン・デキサメタゾン慢性投与($0.03 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$, 10 日間皮下投与)ラットを用いて、高血圧に対する GLP-2 の脳内作用部位を明らかにするため、血圧測定後にホルマリン灌流固定して凍結脳切片標本を作製し、c-Fos タンパク質発現を免疫組織化学的手法により検出した⁹⁾。

(4) マウスに lipopolysaccharide (LPS) $10 \mu\text{g}/5 \mu\text{L}$ を側脳室内投与(i.c.v.)し、3 日後に Y-maze 試験を行い、学習改善作用を評価した。GLP-2 ($0.01\text{-}0.3 \mu\text{g}$)は LPS 投与の 15 分前または Y-maze 試験の 30 分前に i.c.v.投与した。また、(1)と同様の治療抵抗性うつ病マウスを作製し、GLP-2 ($3 \mu\text{g}$)を ACTH 投与 11 日目から 8 日間 i.c.v.投与した。17 日目に

オープンフィールド試験、18 日目に高架式十字迷路試験を行い、抗不安作用を評価した¹⁰⁾。

(5) GLP-2 溶液に β -cyclodextrin (β -CD) 1% と polyoxyethylen(C 25)lauryl ether

(BL-25) 5%を添加した 3 剤混合溶液をラットに経鼻投与し、抗うつ様作用測定後にホルマリン灌流固定して凍結脳切片標本を作製し、バイオサイチン染色法、及び蛍光染色法を用いて染色した。さらに、経鼻投与に適した構造をもつように経鼻投与用 GLP-2 誘導体を新規合成し、その安定性、脳内移行性、抗うつ様作用について検討した¹⁰⁾。

4. 研究成果

(1) GLP-2 投与により視床下部において HPA 系の上位中枢である室傍核 (PVN) での c-Fos 発現数減少と、ここを抑制する背内側核 (DMH) および海馬歯状回前部 (aDG) での発現数増加がみられた。GLP-2 は、GLP-2 受容体発現部位である DMH および aDG 活性化により、ACTH 放出ホルモン (CRH) を分泌する PVN の過剰興奮を抑制して抗うつ作用を発現することが考えられる。GLP-2 投与により HPA 系の上位中枢である室傍核 (PVN) での活性化した CRH 産生細胞が対照群と比較して減少し、PVN を抑制する DMH では活性化した GABA 作動性神経の増加がみられた。GLP-2 受容体が存在する DMH からの抑制性投射の増強により PVN での CRH 産生が抑制されて HPA 系の過活動が抑制されたと考えられる。

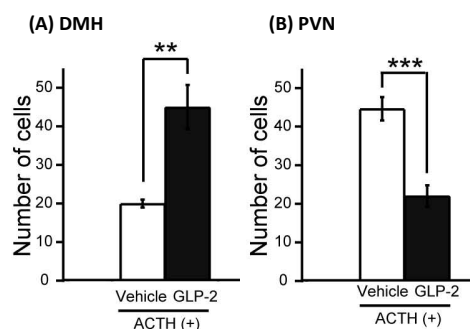


Figure 1. Co-localization of Fos-positive neurons with GAD-positive (A) or CRF-positive neurons (B) in ACTH-treated mice (refer to 9)).

さらに、海馬歯状回顆粒細胞層下帯 (SGZ) での増殖細胞数及び神経前駆細胞数の有意な増加がみられ、GLP-2 が神経新生を促進することが示唆された^⑨。

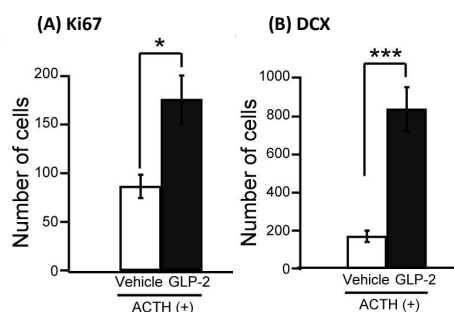


Figure 2. Effects of the chronic administration of GLP-2 on the number of Ki67-positive (A) and DCX-positive cells (B) in the SGZ of ACTH-treated mice (refer to ⑨).

(2) デキサメタゾン慢性投与ラットでは、GLP-2 は脳内血圧調節に関わる孤束核 (NTS) でカテコラミン性ニューロンを抑制し、GABA 性ニューロンの活動を亢進させることにより、その投射先である青斑 (LC) 及び吻側延髄腹外側核 (RVL) ではカテコラミン性ニューロンを抑制した。これにより、脊髓中間外側核への興奮性入力が増弱して交感神経が抑制され、血圧が低下したと考えられる^⑩。

(3) GLP-2 に学習改善作用と抗不安作用があることを報告し^⑪、また GLP-2 の抗うつ様作用発現に脳内で産生される NO が抑制的に働くこと、一方で降圧作用の一部には脳内 NO が関与することを明らかにした。

(4) GLP-2 にβ-CD と BL-25 を添加した 3 剤混合溶液では GLP-2 の安定性が向上し、ラットに経鼻投与した結果、薬液は口腔や胃内には移行せず、脳内では前頭葉から後頭葉にかけて広範囲に分布して抗うつ様作用を示した。

経鼻投与用 GLP-2 誘導体を新規合成し、ラット及びマウスに経鼻投与した結果、中枢に移行して抗うつ様作用を示した。本研究の結果、GLP-2 の安定性が増し、脳内に移行し

て中枢作用を示すペプチド付加体を得ることができた。この付加体は、GLP-2 に限定せず他の中枢作用性ペプチドにも適用可能なことから、国内特許を出願し^⑫、現在は国際特許の出願を準備中である。

(5) 今後は、GLP-2 経鼻投与用製剤の国際特許出願のための追加実験を行うとともに、経鼻投与用製剤化の手法を他の神経ペプチドに応用し、認知症治療薬の開発も試みる。最終的には、上記化合物の臨床研究実施体制を構築する。

<引用文献>

- ① Lecrubier, Y. (2001). The influence of comorbidity on the prevalence of suicidal behavior. *Eur. Psychiatry* 16, 395-399.
- ② Oka, J-I., et al. (2000). Endogenous GLP-1 is involved in β-amyloid protein-induced memory impairment and hippocampal neuronal death in rats. *Brain Res.* 878, 194-198.
- ③ Iwai, T., et al. (2006). Glucagon-like peptide-1 inhibits LPS-induced IL-1β production in cultured rat astrocytes. *Neurosci. Res.* 55, 352-360.
- ④ Iwai, T., et al. (2008). Neuromedin U inhibits inflammation-mediated memory impairment and neuronal cell-death in rodents. *Neurosci. Res.* 61, 113-119.
- ⑤ Drucker, DJ., et al. (1996). Induction of intestinal epithelial proliferation by glucagon-like peptide-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93, 7911-7916.
- ⑥ Tsai, CH., et al. (1997). Intestinal growth-promoting properties of glucagon-like peptide-2 in mice. *Am. J. Physiol.* 273, 77-84.
- ⑦ Iwai, T., et al. (2009). Antidepressant-like effects of glucagon-like peptide-2 in

mice occur via monoamine pathways. *Behav. Brain Res.* 204, 235-240.

⑧ Iwai, T., et al. (2013). Glucagon-like peptide-2 but not imipramine exhibits antidepressant-like effects in ACTH-treated mice. *Behav. Brain Res.* 243, 153-157.

⑨ Sasaki-Hamada, S., et al. (2015). Immunohistochemical determination of the site of antidepressant-like effects of glucagon-like peptide-2 in ACTH-treated mice. *Neuroscience* 294, 156-165.

⑩ Sasaki-Hamada, S., et al. (2013). Neuronal Fos-like immunoreactivity in dexamethasone-induced hypertension of rats and effect of glucagon-like peptide-2. *Life Sciences* 93(23), 889-896.

⑪ Iwai, T., et al. (2015). Glucagon-like peptide-2-induced memory improvement and anxiolytic effects in mice. *Neuropeptides* 49(1), 7-14.

⑫ 山下 親正、岡 淳一郎、堀口 道子、濱田 幸恵 (2014). 中枢作用性ペプチド誘導体、点鼻剤、抗うつ剤、及び認知障害改善剤. 特願 2014-184436.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 3 件)

① Sachie Sasaki-Hamada, Yoichi Yuri, Maho Hoshi, Jun-Ichiro Oka (2015).

Immunohistochemical determination of the site of antidepressant-like effects of glucagon-like peptide-2 in ACTH-treated mice. *Neuroscience* 294, 156-165. 査読有. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2015.03.010

② Takashi Iwai, Kazushi Jin, Tomoko Ohnuki, Sachie Sasaki-Hamada, Minami Nakamura, Akiyoshi Saitoh, Azusa Sugiyama, Masaatsu Ikeda, Mitsuo Tanabe, Jun-Ichiro Oka (2015).

Glucagon-like peptide-2-induced memory improvement and anxiolytic effects in mice. *Neuropeptides* 49(1), 7-14. 査読有.

DOI: 10.1016/j.npep.2014.11.001

③ Takashi Iwai, Toshihiro Sawabe, Kahori Tanimitsu, Manabu Suzuki, Sachie Sasaki-Hamada, Jun-Ichiro Oka (2014).

Glucagon-like peptide-1 protects synaptic and learning functions from neuro-inflammation in rodents. *Journal of Neuroscience Research* 92(4), 446-454.

査読有. DOI: 10.1002/jnr.23335

④ Sachie Sasaki-Hamada, Kaori Ito, Jun-Ichiro Oka (2013). Neuronal Fos-like immunoreactivity in dexamethasone-induced hypertension of rats and effect of glucagon-like peptide-2. *Life Sciences* 93(23), 889-896. 査読有.

DOI: 10.1016/j.lfs.2013.10.016

⑤ Takashi Iwai, Maki Kaneko, Sachie Sasaki-Hamada, Jun-Ichiro Oka (2013).

Characterization of the hypotensive effects of glucagon-like peptide-2 in anesthetized rats. *Neuroscience Letters* 550, 104-108. 査読有. DOI: 10.1016/j.neulet.2013.07.004

⑥ Takashi Iwai, Tomoko Ohnuki, Sachie Sasaki-Hamada, Akiyoshi Saitoh, Azusa Sugiyama, Jun-Ichiro Oka (2013).

Glucagon-like peptide-2 but not imipramine exhibits antidepressant-like effects in ACTH-treated mice. *Behavioral Brain Research* 243, 153-157. 査読有.

DOI: 10.1016/j.bbr.2013.01.010

⑦ Sachie Sasaki-Hamada, Hiroaki Sacai, Jun-Ichiro Oka (2012). Diabetes onset influences hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-induced rats.

Neuroscience 227, 293-304. 査読有.

DOI: 10.1016/j.neuroscience.2012.09.081

〔学会発表〕(計81件)

① 鈴木 あずさ、濱田 幸恵、恒岡 弥生、松本 欣三、岡 淳一郎 (2014)。強制水泳試験を用いた釣藤散の抗うつ様作用の検討。第131回日本薬理学会関東部会、横浜市立大学福浦キャンパス(神奈川県・横浜市)平成26年10月11日。

② 中尾 優介、中村 龍治、堀口 道子、濱田 幸恵、岡 淳一郎、山下親正(2014)。

Glucagon-like peptide-2の中枢移行性を目指した点鼻製剤の開発。第58回日本薬学会関東支部大会、昭和薬科大学(東京都・町田市)平成26年10月4日。

③ 中村 龍治、中尾 優介、恒岡 弥生、堀口 道子、濱田 幸恵、山下 親正、岡 淳一郎 (2014)。GLP-2経鼻投与用製剤の中枢作用。第130回日本薬理学会関東部会、星薬科大学百年記念館(東京都・品川区)平成26年7月5日。

④ 星 真帆、恒岡 弥生、濱田 幸恵、岡 淳一郎 (2014)。GLP-2の抗うつ作用メカニズムの解明。第130回日本薬理学会関東部会、星薬科大学百年記念館(東京都・品川区)平成26年7月5日。

⑤ 濱田 幸恵、岡 淳一郎、堀口 道子、山下親正 (2014)。新規神経ペプチド薬の中枢移行性を目指したDDS研究、第7回トランスレーショナルリサーチ部門公開セミナー(東京理科大学総合研究機構)、東京理科大学薬学部(東京都・野田市)平成26年1月11日。

⑥ 濱田 幸恵、由利 洋一、岡 淳一郎 (2013)。Glucagon-like peptide-2の抗うつ作用における免疫組織化学的な検討。第36回日本神経科学大会(Neuro2013)、国立京都国際会館(京都府・京都市)平成25年6月21日。

⑦ Sachie Sasaki-Hamada, Hiroaki Sacai, Jun-Ichiro Oka (2012)。Diabetes onset influences hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-treated rats. Neuroscience 2012, Ernest N. Morial

Convention Center, New Orleans (U.S.A.). October 17, 2012.

⑧ 伊藤 歌及里、濱田 幸恵、岡 淳一郎 (2012)。Dexamethasone誘発性高血圧モデルラットにおけるglucagon-like peptide-2の降圧作用。第56回日本薬学会関東支部大会、昭和大学旗の台キャンパス(東京都・品川区)平成24年10月13日。

〔図書〕(計2件)

① 岡 淳一郎 (2013)。中枢神経系に作用する薬物。パートナー 薬理学 改訂第2版(重信弘毅 監修, 石井邦雄、栗原順一 編集), 南江堂, 481 (pp. 83-146)。 (2013年3月15日)

② 岡 淳一郎 (2015)。編集・薬物作用の分類、薬物作用のメカニズム、薬物の用量と作用。MRテキストI 医薬品情報 2012 2015 改訂(大谷壽一、岡 淳一郎、折井孝男 編集), 公認財団法人MR研修センター, 175 (pp. 130-141)。 (2015年3月)

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称: 中枢作用性ペプチド誘導体、点鼻剤、抗うつ剤、及び認知障害改善剤

発明者: 山下 親正、岡 淳一郎、堀口 道子、濱田 幸恵

権利者: 学校法人東京理科大学

種類: 特許権

番号: 特願 2014-184436

出願年月日: 2014年9月10日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ

http://www.tus.ac.jp/fac_grad/p/index.php?371d

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡 淳一郎 (OKA, Jun-Ichiro)

東京理科大学・薬学部・教授

研究者番号: 40134613

(2) 連携研究者

濱田 幸恵 (SASAKI-HAMADA, Sachie)

東京理科大学・薬学部・ポストドクトラル研究員

研究者番号: 00399320