

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591673

研究課題名(和文) 気分障害の発症機序における情動ストレスの役割に関する研究

研究課題名(英文) A study to clarify the role of emotional stress for the pathogenesis of mood disorders

研究代表者

井上 猛 (INOUE, TAKESHI)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70250438

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：情動ストレスの動物モデルを用いて、新規抗うつ薬であるmirtazapineの作用機序解明を行った。Mirtazapineの抗不安作用の作用部位が正中縫線核であり、その作用が α_2 受容体遮断作用によること、さらにリチウム亜慢性投与がmirtazapineの抗不安作用を増強することが明らかになった。母子分離ストレスと慢性ストレス誘発モデルを組み合わせたユニークなうつ病動物モデルを作成し、行動学的、分子生物学的研究を行った。扁桃体のneurotensin受容体1と成体ラット海馬由来神経前駆細胞のretinoic acid受容体 α のメチル化促進を介したmRNA発現低下が同モデルで認められた。

研究成果の概要(英文)：We clarified the mechanism of the anxiolytic action of mirtazapine, a new antidepressant, by using an animal model of emotional stress. We showed that the anxiolytic effect of mirtazapine is mediated by the α_2 antagonism in the median raphe nucleus and that subchronic lithium enhances the anxiolytic effect of mirtazapine. We developed the new unique animal model of depression that consists of maternal separation and chronic mild stress and conducted behavioral and molecular biological experiments in this model. Our results showed that maternal separation decreased the mRNA expression of neurotensin receptor 1 in the adult amygdala and retinoic acid receptor α in the adult dentate gyrus-derived neural precursor cells.

研究分野：医歯薬学

キーワード：気分障害 恐怖条件付け 情動ストレス mirtazapine 正中縫線核 扁桃体 neurotensin受容体1 retinoic acid受容体

1. 研究開始当初の背景

Caspiら(Science 301: 386-389, 2003)のコホート研究により、幼少期のストレスと成人期のストレスの両方がうつ病発症の危険因子になることが明らかになり、気分障害の発症、病態、症状増悪において情動ストレスが重要な役割をはたしていることは臨床的に周知の事実となった。したがって、情動ストレスの脳への影響を研究することは気分障害の発症、病態、症状増悪の機序の解明につながると思われる。一方、不安・恐怖などの情動ストレスに関する神経科学的研究が近年急速に進み、扁桃体-視床背内側核-前頭前野-扁桃体の神経回路(Yakovlev回路)と海馬、中隔が情動ストレスに関与し、とりわけ扁桃体が必須の役割をはたしていることが多くの脳局所破壊実験により明らかになった(LeDoux JE)。さらに、これらの動物実験の結果から最近ではヒトを対象としたfunctional MRIやPET研究により扁桃体が不安・恐怖などの情動ストレスに深く関与していることが証明された。しかし、扁桃体内の様々な神経伝達物質や細胞内情報伝達系の情動ストレスにおける役割は十分に解明されていない。

研究代表者はこれまで十数年以上にわたり、心理的ストレスであるconditioned fear stress model(CFS、恐怖条件付けストレスモデル)を用いて、CFSの際の神経伝達物質、転写因子の変化を扁桃体で詳細に検討し、論文として発表してきた。その結果、1)CFSによる不安行動(すくみ行動)を選択的セロトニン再取り込み阻害薬(SSRI)全身投与が減弱すること、2)CFSによって扁桃体のセロトニン及びドパミン神経伝達と転写因子であるc-Fos蛋白発現が亢進すること、3)扁桃体破壊と扁桃体へのSSRI局所投与が不安行動を抑制すること、4)SSRIはCFSによるc-Fos発現を抑制すること、を明らかにした。これらの結果から、SSRIの情動に対する効果が扁桃体の神経活動に対する抑制作用を介しているという結論を得た。米国のLeDoux JE、Fanselow M、Maren S、Davis Mらの研究者らはCFSにおけるグルタミン酸の役割を脳局所投与実験によって明らかにしてきたが、情動ストレスにおける扁桃体セロトニンの機能的役割についてはこれまで報告がなく、我々の報告が初めてのものであり、我々の研究はこの領域においては国際的にも先端的である。

CFSにおけるSSRIの作用機序については解明は進んだが新規抗うつ薬であるmirtazapineの作用機序についてはまだ十分に解明されていない。さらにCFSは情動ストレスモデルであるが、急性のモデルでありうつ病のモデルとはいえない。これまで多因子疾患であるうつ病の病態に則した動物モデルは発表されたことがない。特に最近うつ病の病因として注目されているepigeneticsの変化をうつ病の動物モデルで検討した研究

はこれまでにない。

2. 研究の目的

以上の研究背景から、本研究では下記のテーマについて種々の行動薬理・神経化学的研究を行うことを目的とした。

(1)CFSにおけるmirtazapineの抗不安作用の作用脳部位を脳局所投与実験によって明らかにする。さらに、以前に我々が明らかにしたmirtazapine全身投与の抗不安作用に対するリチウム増強作用がmirtazapine脳局所投与でもみられるかどうかを確認する。

(2)母子分離ストレスと慢性ストレス誘発モデルを組み合わせたうつ病モデルにおける、行動学的、神経化学的变化を検討する。

(3)母子分離ストレスが脳内のepigeneticsに及ぼす影響を検討する。

(4)脳内微小透析実験によって、難治性うつ病の治療薬であるaripiprazoleの作用機序を解明する。

3. 研究の方法

(1)短時間(5分間)のフットショック・ストレス(床の金属グリッドに電流を流し、四肢に痛みを加えることにより負荷)をラットに負荷し、翌日ショック箱にフットショックを与えないで5分間再曝露することによりCFSをラットに与える。フットショックを加えないでショック箱にラットを置く操作は痛み等の身体的刺激を含まないため、CFSは純粋な心理的ストレスあるいは情動ストレスとみなされる。通常探索行動が活発にみられる場面で、数分間以上にわたって、じっと身動きしない行動がすくみ行動と呼ばれる。すくみ行動を不安・恐怖の指標として用い、新規抗うつ薬であるmirtazapine、選択的2受容体遮断薬であるatipamezoleの海馬、扁桃体、正中縫線核への脳局所投与の効果を行動薬理的に検討した。

(2)(1)と同様に、CFSモデルを用いて、mirtazapine局所投与によるすくみ行動抑制効果に対して、リチウム亜慢性投与の併用が及ぼす影響について行動薬理的に検討した。

(3)母子分離ストレスと慢性ストレス誘発モデルを組み合わせたうつ病モデルに関する行動学的、神経化学的検討を行った。Sucrose preference testでsucroseに対する嗜好性を検討し、その他、オープンフィールド試験、強制水泳試験を行動的に検討した。また母子分離ストレスによる扁桃体における様々なmRNA発現の変化、成体ラット海馬由来神経前駆細胞における様々なmRNA発現の変化をRT-PCR法により定量的に測定した。さらに母子分離ストレスと慢性ストレス誘発モデルの組み合わせが海馬、扁桃体などにおけるmRNA発現、蛋白発現にどのような影響を与えるのかを検討した。

(4)保険適応が承認され、最近注目されている難治性うつ病の治療薬であるaripiprazoleの

作用機序解明のため、脳内微小透析実験により、前頭葉、側坐核のドパミン、セロトニン、ノルアドレナリン濃度の変化に対する薬物投与の影響を検討した。Aripiprazole 投与後に、代表的な SSRI である sertraline を投与し、sertraline の効果への aripiprazole の調整効果を検討した。

4. 研究成果

(1) 恐怖条件付けストレスモデルを用いた mirtazapine の効果の検討：

新規抗うつ薬である mirtazapine がラットの恐怖条件付けストレスで抗不安作用を示すことをこれまで明らかにしてきたが、その作用脳部位は不明であった。mirtazapine を条件恐怖の前に扁桃核、海馬、正中縫線核に局所投与したところ、正中縫線核への投与のみが条件恐怖によって惹起される不安行動であるすくみ行動を有意に抑制した。その作用機序としては、mirtazapine が正中縫線核の 2 受容体を遮断し、放出促進したノルアドレナリンが 1 受容体を刺激し、正中縫線核の投射脳領域である海馬の細胞外セロトニン濃度を増加させて抗不安作用を惹起するという仮説が考えられた。

さらに、恐怖条件付けストレスにおける mirtazapine の抗不安作用に対するリチウム増強効果が mirtazapine の正中縫線核脳局所投与に対しても生じるかどうかを確認した。その結果、全身投与と同様に、mirtazapine の正中縫線核脳局所投与による抗不安作用をリチウム亜慢性投与が増強することを確認した。したがって、リチウムによる mirtazapine の抗不安作用増強効果は正中縫線核から海馬などの投射領域までの脳部位における薬理的相互作用による可能性が示唆された。この仮説の検証のために、選択的な 2 受容体遮断薬である atipamezole を正中縫線核に投与して恐怖条件付けストレスに対する作用を検討したところ mirtazapine と同様に抗不安作用を示した。したがって、正中縫線核における 2 受容体遮断が抗不安作用の機序であることが示唆された。

(2) 母子分離ストレスと慢性ストレス誘発モデルを組み合わせたうつ病モデルに関する行動学的、神経化学的検討：

母子分離ストレスと慢性ストレス誘発モデルを組み合わせたうつ病モデルに関する行動学的検討を行った。慢性ストレス誘発モデルにより sucrose preference test で sucrose に対する嗜好性が低下すること、自発運動量が低下することを追試確認した。

母子分離ストレスと慢性ストレス誘発モデルを組み合わせたうつ病モデルでは、SSRI である sertraline の 2 週間投与は sucrose preference test における嗜好性低下に影響を与えなかった。したがって、両ストレスを組み合わせたモデルは難治性うつ病のモデルである可能性が示唆された。

母子分離ストレスと慢性ストレス誘発モ

デルの組み合わせの海馬の mRNA 発現、海馬・扁桃核・前頭葉皮質・腹側被蓋野のタンパク発現に対する効果を検討したが、有意な変化を示した物質はこれまでのところ見つからなかった。さらに検討を続ける予定である。

(3) 母子分離ストレスの行動学的、分子生物学的影響：

母子分離ストレスによって、成体扁桃核の CRH、neurotensin 受容体 1 の mRNA 発現が低下すること、neurotensin 受容体 1 の mRNA 発現低下の機序が neurotensin1 受容体の DNA メチル化亢進であることが明らかになった。すなわち、母子分離ストレスによって neurotensin 受容体 1 DNA の epigenetic な変化が惹起され、mRNA 発現が低下したと考えられる。さらに、neurotensin 受容体 1 機能の低下により母子分離ストレスをうけた成体ラットでは恐怖条件付けストレスによる不安症状が強く出現することが、neurotensin 受容体 1 アゴニスト、アンタゴニストによる行動薬理実験から明らかになった。

さらに、母子分離ストレスは、成体ラット海馬由来の神経前駆細胞において DNA methyltransferase の活性を高め、epigenetic な影響を通して retinoic acid 受容体の発現を低下させることによって、神経前駆細胞から神経への分化を抑制することが明らかになった。この結果は母子分離ストレスが神経新生に影響することを ex vivo の実験で明らかにした。

(4) 脳内微小透析実験を用いた aripiprazole の難治性うつ病に対する効果の作用機序に関する検討：

難治性うつ病の治療薬として現在国内外で承認されている aripiprazole の作用機序を解明するために、脳内微小透析実験を行った。aripiprazole を投与後、代表的な抗うつ薬である SSRI の sertraline を投与したところ、aripiprazole は側坐核の細胞外セロトニン、ノルアドレナリン濃度には影響しなかったが、sertraline によるドパミン濃度上昇をより増強した。したがって、側坐核のドパミン増強作用が aripiprazole の難治性うつ病に対する効果の作用機序であることが示唆された。

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15件)

An Y, Inoue T, Kitaichi Y, Nakagawa S, Wang C, Chen C, Song N, Kusumi I: Subchronic lithium treatment increases the anxiolytic-like effect of mirtazapine on the expression of contextual conditioned fear. *Eur J Pharmacol* 747:13-17,2015.

- DOI: 10.1016/j.ejphar.2014.11.009. 査読有
- Boku S, Toda H, Nakagawa S, Kato A, Inoue T, Koyama T, Hiroi N, Kusumi I: Neonatal maternal separation alters the capacity of adult neural precursor cells to differentiate into neurons via methylation of retinoic acid receptor gene promoter. *Biol Psychiatry* 77:335-344, 2015. DOI: 10.1016/j.biopsych.2014.07.008. 査読有
- Kitaichi Y, Inoue T, Nakagawa S, Omiya Y, Song N, An Y, Chen C, Kusumi I, Koyama T: Local infusion of citalopram into the amygdala decreased conditioned fear of rats through increasing extracellular serotonin levels. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 54:216-222, 2014. DOI:10.1016/j.pnpbp.2014.05.018. 査読有
- Toda H, Boku S, Nakagawa S, Inoue T, Kato A, Takamura N, Song N, Nibuya M, Koyama T, Kusumi I: Maternal separation enhances conditioned fear and decreases the mRNA levels of the neurotensin receptor 1 gene with hypermethylation of this gene in the rat amygdala. *PLoS One* 9(5):e97421, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0097421. 査読有
- Masuda T, Inoue T, An Y, Takamura N, Nakagawa S, Kitaichi Y, Koyama T, Kusumi I: Effect of the co-administration of citalopram with mirtazapine or atipamezole on rat contextual conditioned fear. *Neuropsych. Dis. Treat.* 10:289-295, 2014. DOI: 10.2147/NDT.S55507. 査読有
- Takamura N, Nakagawa S, Masuda T, Boku S, Kato A, Ning S, An Y, Kitaichi Y, Inoue T, Koyama T, Kusumi I: The effect of dopamine on adult hippocampal neurogenesis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 50: 116-124, 2014. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2013.12.011. 査読有
- Takamura N, Nakagawa S, Masuda T, Boku S, Kato A, Ning S, An Y, Kitaichi Y, Inoue T, Koyama T, Kusumi I: The effect of dopamine on adult hippocampal neurogenesis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 50: 116-124, 2014. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2013.12.011. 査読有
- Boku S, Nakagawa S, Masuda T, Nishikawa H, Kato A, Takamura N, Omiya Y, Kitaichi Y, Inoue T, Koyama T: Valproate recovers the inhibitory effect of dexamethasone on the proliferation of the adult dentate gyrus-derived neural precursor cells via GSK-3 β and β -catenin pathway. *Eur J Pharmacol* 723: 425-430, 2013. DOI: 10.1016/j.ejphar.2013.10.060. 査読有
- Boku S, Hisaoka-Nakashima K, Nakagawa S, Kato A, Kajitani N, Inoue T, Kusumi I, Takebayashi M: Tricyclic antidepressant amitriptyline indirectly increases the proliferation of adult dentate gyrus-derived neural precursors: an involvement of astrocytes. *PLoS ONE* 8(11):e79371, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0079371. 査読有
- An Y, Inoue T, Kitaichi Y, Izumi T, Nakagawa S, Song N, Chen C, Li XB, Koyama T, Kusumi I: Anxiolytic-like effect of mirtazapine mediates its effect in the median raphe nucleus. *Eur J Pharmacol* 720: 192-197, 2013. DOI: 10.1016/j.ejphar.2013.09.078. 査読有
- Boku S, Nakagawa S, Takamura N, Kato A, Takebayashi M, Hisaoka-Nakashima K, Omiya Y, Inoue T, Kusumi I: GDNF facilitates differentiation of the adult dentate gyrus-derived neural precursor cells into astrocytes via STAT3. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 434:779-784, 2013. DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.04.011. 査読有
- Boku S, Nakagawa S, Toda H, Kato A, Takamura N, Omiya Y, Inoue T, Koyama T: ROCK2 regulates \square FGF-induced proliferation of SH-SY5Y cells through GSK-3 \square and \square -catenin pathway. *Brain Res* 1492: 7-17, 2013. DOI: 10.1016/j.brainres.2012.11.034 査読有
- Song N, Nakagawa S, Izumi T, Toda H, Kato A, Boku S, Inoue T, Sakagami H, Li X, Koyama T: Involvement of CaMKIV in neurogenic effect with chronic fluoxetine treatment. *Int J Neuropsychopharmacol.* 16:803-812, 2013. DOI: 10.1017/S1461145712000570. 査読有
- Takamura N, Masuda T, Inoue T, Nakagawa S, Koyama T: The effects of the co-administration of the α 1-adrenoreceptor antagonist prazosin on the anxiolytic effect of citalopram in conditioned fear stress in the rat. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 39(1):107-111, 2012. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2012.05.017. 査読有
- Kitaichi Y, Inoue T, Nakagawa S, Boku S, Kato A, Kusumi I, Koyama T: Effect of

triiodothyronine (T3) augmentation of acute milnacipran administration on monoamine levels: an in vivo microdialysis study in rats. *Neuropsych. Dis. Treat.* 8:501-507, 2012. DOI: 10.2147/NDT.S36906. 査読有

[学会発表](計 3 件)

井上 猛: 難治性うつ病はなぜ難治なのか? その解決法について. 第 24 回日本臨床精神神経薬理学会・第 44 回日本神経精神薬理学会、2014.11.22、名古屋国際会議場(名古屋)

井上 猛: 不安障害と気分障害の併存(シンポジウム「不安障害と気分障害の併存」) 第 110 回 日本精神神経学会学術総会、2014.5.27、パシフィコ横浜(横浜)

An Y, Inoue T, Kitaichi Y, Izumi T, Nakagawa D, Song N, Chen C, Li XB, Kusumi I: Anxiolytic effects of mirtazapine microinjection in the median raphe nucleus and subchronic lithium carbonate enhances this effect. In: 3rd Congress of The Asian College of Neuropsychopharmacology, 2013 .9.14, Beijing(China)

Nakagawa S, Song N, Kato A, An Y, Inoue T, Li XB, Kusumi I: Involvement of CaMKIV in antidepressant actions. 42nd Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2013.9.13, San Diego (USA)

Boku S, Hisaoka-Nakashima K, Nakagawa S, Kato A, Kajitani N, Inoue T, Kusumi I, Takebayashi M: Tricyclic antidepressant amitriptyline indirectly increases the proliferation of adult dentate gyrus-derived neural precursor cells via inducing FGF2 secretion from astrocytes. 42nd Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2013.9.12, San Diego (USA)

Nakagawa S, Takamura N, Boku S, Song N, Inoue T, Kusumi I: Effect of dopamine on adult hippocampal neurogenesis. 11th World Congress of Biological Psychiatry, 2013.6.25, 国立京都国際会館(京都)

安 燕、井上 猛、北市雄士、中川 伸、泉 剛、宋 寧、陳 沖、小山 司: 恐怖条件付けにおける mirtazapine の抗不安効果とそのリチウム増強効果は正中縫線核への効果を介している. *Neuro2013*, 2013.6.22、国立京都国際会館(京都)

井上 猛: 不安障害の病態生理: 動物モデルによる神経科学的解明(トピックフォーラム「不安障害の慢性化に対する新しいアプローチ」). 第 109 回 日本精神神経学

会学術総会、2013.5.23、福岡サンパレスホテル&ホール(福岡)

Boku S, Toda H, Nakagawa S, Kato A, Takamura N, Omiya Y, Inoue T, Koyama T: Maternal separation attenuates neural differentiation of adult dentate gyrus-derived neural precursors through increasing DNA methylation of RAR α promoter. Society of Biological Psychiatry 68th annual meeting, 2013.5.16, San Francisco(USA)

井上 猛: 子供の時のストレスとうつ(シンポジウム 10「恐怖記憶からみた精神疾患」). 第 22 回日本臨床精神神経薬理学会・第 42 回日本神経精神薬理学会 合同年会、2012.10.20、栃木県総合文化センター(宇都宮)

Boku S, Toda H, Nakagawa S, Kato A, Takamura N, Omiya Y, Inoue T, Koyama T: Maternal separation attenuates neural differentiation of adult dentate gyrus-derived neural precursors through increasing DNA methylation of retinoic acid receptor promoter. 42th Annual Meeting of Society for Neuroscience, 2012.10.17, New Orleans (USA)

Nakagawa S, Takamura N, Boku S, Song N, Kato A, Inoue T: Effect of dopamine on adult hippocampal neurogenesis. 42th Annual Meeting of Society for Neuroscience, 2012.10.15, New Orleans (USA)

安 燕、井上 猛、北市雄士、中川 伸、泉 剛、宋 寧、小山 司: Subchronic lithium carbonate potentiates the effect of mirtazapine treatment on the conditioned fear. 第 34 回日本生物学的精神医学会、2012.9.29、神戸国際会議場(神戸)

[図書](計 1 件)

井上 猛 他、医学書院、不安の生物学. 不安障害診療のすべて<精神科臨床エキスパート>、2013、p 20-27

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 猛(INOUE, TAKESHI)

北海道大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号: 70250438