

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592133

研究課題名(和文) 頭部外傷後のうつ病発症に関わるストレス感受性分子の同定とその機序の解明

研究課題名(英文) Determination of stress sensitivity molecules that exacerbate depression after head injury

研究代表者

東 洋一郎 (HIGASHI, Youichirou)

高知大学・教育研究部医療学系・助教

研究者番号：80380062

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)：今回の検討より、複合多糖並びにリポ多糖類はマウスにおける脳振とう誘発性うつ病様行動に影響を及ぼさないことを見出した。膜透過性亜鉛キレート剤投与は脳振とう誘発性うつ病様行動と海馬におけるミクログリアの活性化を抑制することを見出した。活性酸素除去剤であるエダラボンは脳振とう直後のマウスへ投与するとうつ病様行動ならびに海馬における酸化ストレスとアストロサイト内5-lipoxygenaseの活性化を抑制することを明らかにした。これらの結果は、亜鉛キレート剤並びにエダラボンが脳振とう誘発性うつ病を抑制すること、そしてこの保護効果にグリア関連性脳内炎症反応の抑制作用が関与していることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：We examined whether complex polysaccharide and lipopolysaccharide effect on concussion-induced depressive-like behavior in mice, but they had no effect on depressive-like behavior in the forced swim test. Furthermore, we investigated the effect of a membrane-permeable zinc chelater (ZC) or a free radical scavenger edaravone (Ed) on concussion-induced depressive-like behavior. Mice were intravenously administered ZC and Ed before and immediately after impact, respectively. We found that ZC suppressed depressive-like behavior and microglial activation in the hippocampus 1 day after concussion. Ed also attenuated concussion-induced depressive-like behavior, which was accompanied by inhibition of increased hippocampal oxidative stress and suppression of 5-lipoxygenase activation in hippocampal astrocytes. These results suggest that ZC and Ed protect against concussion-induced depression, and these protections are mediated by suppression of glial cell-associated brain inflammation.

研究分野：医歯薬学

キーワード：頭部外傷 うつ病 脳内亜鉛 グリア細胞

1. 研究開始当初の背景

交通事故や転倒などによる頭部外傷は年間 28 万人にのぼると推定されている。頭部外傷を負うと記憶障害などの高次脳機能障害が長期にわたって持続し、社会復帰が困難になることから重要な問題として認識されている。昨今、高次脳機能障害に対する診断やリハビリが盛んに検討されているが、このような患者では、しばしばうつ病を発症し、リハビリや社会復帰への悪影響が危惧されている。さらに、このような患者では症状が顕著であっても適切な診断や治療が行われにくいことから、新たな医学的ならびに社会的問題となっている。これらのことから頭部外傷後のうつ病発症に対する検査法や予防法ならびに治療法の開発の必要性が認識されている。しかし頭部外傷とうつ病発症の因果関係に関して、頭部外傷が 1 次的なトリガーとして分子や細胞を変化させ、その後の環境ストレスに対する感受性を高めることが要因となる可能性に関してはほとんど解明されていない。

グリア細胞、特にミクログリアとアストロサイトは頭部外傷の重篤化に関与しているが、その一方で、様々なストレスによって誘発されるうつ病の発症や病態にも大きく関わっている。

しかし頭部外傷後の環境ストレスに対する感受性変化に関わる分子が存在するか否か、またこれにグリア細胞が関与するか否かは明らかでない。

2. 研究の目的

頭部外傷患者はしばしば「うつ病」を発症するが、損傷が直接の原因となる他に、損傷が基礎にあり、その後の環境ストレスと合わさって発症する可能性も議論されている。本研究計画では、頭部外傷後に変化する分子のうち環境ストレスに対する感受性を高める分子を同定し、うつ病発症への関与を詳細に解析することで、全く新しい頭部外傷後のうつ病発症に対する検査法や予防法ならびに治療法の開発を研究の全体構想としている。また本研究では頭部外傷とうつ病の病態に関与することが報告されている亜鉛に着目して、(1)頭部外傷モデルマウスに慢性緩和ストレス(ヒトのうつ病発症危険因子を考慮した慢性的な緩和なストレス)を与え、このストレスに対する感受性が高まるか否かとその感受性変化に亜鉛が関与しているか否かを明らかにし、さらに(2)頭部外傷後に発現変化している亜鉛関連分子を同定して感受性変化への関与と発現変化の機序を詳細に解析することを目的としている。

3. 研究の方法

(1)脳振とうモデルマウスを weight-drop 法により作成し、受傷直後に藻類由来の複合多糖を投与することでうつ病様行動が阻止できるか否かを強制水泳試験により検討し

た。

(2)脳振とうモデルマウスを weight-drop 法により作成した。受傷後に炎症ストレスを負荷する目的で内毒素を腹腔内へ投与し、強制水泳試験によりうつ病様行動が増悪するか否かを検討した。

(3)脳内キレート剤亜鉛を脳振とう受傷時に一過性にキレートするため、マウスに膜透過性亜鉛キレート剤を前投与した。その後 weight-drop 法により脳振とうを負荷し、強制水泳試験によりうつ病様行動を解析した。さらに脳内ミクログリアの活性化レベルに関して抗 CD11b 抗体を用いて免疫組織化学染色法により検討した。

(4)脳振とう受傷直後のマウスへ脳卒中治療薬エダラポンを投与し、うつ病様行動を強制水泳試験により検討した。さらに脳振とう受傷後の大脳皮質および海馬領域における酸化ストレスレベルを抗 4-hydroxynonenal 抗体を用いてウエスタンブロット法により検討し、併せて活性酸素産生酵素 NADPH oxidase の阻害剤を脳振とう受傷マウスに投与し、その効果を同様の方法で検討した。脳振とう受傷後のマウス脳切片を作成し、抗 5-lipoxygenase 抗体およびアストロサイトのマーカーである GFAP に対する抗体を用いて免疫組織化学染色を行い、その後 5-lipoxygenase 阻害剤の効果を検討するために脳振とう受傷後マウスに尾静脈より投与し、強制水泳試験を用いて検討した。

4. 研究成果

(1)脳振とう受傷 3 日後、強制水泳試験において脳振とう群マウスはコントロール(非脳振とう負荷)群マウスに比べて試験時の無動時間が有意に増加した。この結果は脳振とうによってマウスにうつ病様行動が惹起されていることを示している。また、今回の検討において当初の予想とは異なり、脳振とう受傷直後に藻類由来の複合多糖を投与したマウスは強制水泳試験時の無動時間の増加が抑制されることがなかった。投与した藻類由来の複合多糖はサイトカイン遺伝子(IL-17ならびに IFN γ など)の発現誘導を抑制することが既に報告されている。最近のうつ病研究により、脳内の炎症反応がうつ病発症に関与していると指摘されており、その一方で脳振とうをはじめとする頭部外傷において受傷後の脳内炎症がその後の病態に関与していることもよく知られている。今回の検討において藻類由来の複合多糖は脳振とう負荷後に惹起されるうつ病様行動に影響を及ぼさなかったが、これは脳振とう負荷によって惹起されるうつ病様行動にサイトカイン遺伝子の発現誘導の関与が低いことを推量させる大変興味深い成果である。

(2) 脳振とう受傷マウスにおけるストレス感受性を検討するため、脳振とう受傷後マウスに内毒素を投与することで炎症ストレスを負荷し、うつ病様行動を強制水泳試験で検討した。その結果、脳振とう+偽投与群と脳振とう+内毒素投与群の間で有意な差は認められなかった。頭部外傷患者はしばしば「うつ病」を発症するが、損傷が直接の原因となる他に、損傷が基礎にあり、その後の環境ストレスと合わさって発症する可能性も議論されている。今回の結果は前述の可能性を必ずしも否定するものではなく、少なくとも内毒素投与による炎症ストレスは脳振とうによって惹起されるうつ病様行動を増悪化しないことを示唆する重要な成果である。

(3) 脳内キレート剤は、主に大脳皮質ならびに海馬領域のグルタミン酸神経細胞内シナプス小胞に貯蔵されている。このキレート剤は頭部外傷などを負うと細胞外へ過剰に放出され、その後の神経細胞死の誘導に大きく関与していることが知られている。今回の検討から、脳振とう+キレート剤偽投与群で観察された強制水泳試験時の無動時間の増加が膜透過性キレート剤の前投与により有意に減少し、さらに脳振とう後の海馬におけるミクログリア活性化マーカーの免疫反応性亢進が膜透過性キレート剤により抑制されることが明らかになった(図1)。以前、報告者らは細胞外に過剰放出される脳内キレート剤がミクログリアの活性化因子として機能することを発見し報告しており、うつ病発症にミクログリアの活性化が関与していることも知られている。以上のことから、これらの結果は脳振とう誘発性うつ病様行動の機序に脳内キレート剤とミクログリアの活性化が関与していることを示唆する重要な成果である。

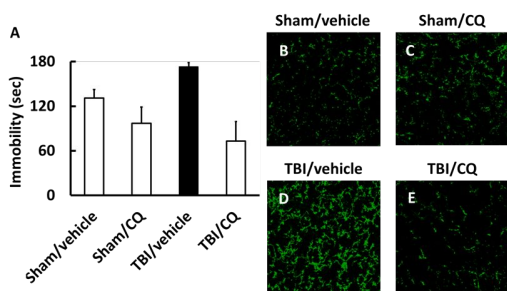


図1 脳振とう誘発性うつ病様行動に対する膜透過性キレート剤の効果。A:強制水泳試験による検討の結果。B~E: 免疫組織化学染色法による検討の結果。

(4) 脳振とう受傷直後のマウスに脳卒中治療薬エダラボンを投与したところ、その後に惹起されるうつ病様行動が阻止されることを見出した(図2)。エダラボンは活性酸素種除去能を有していることから、脳振とう後のマウス大脳皮質および海馬における酸化ストレスレベルを検討した。その結果、脳振とう負荷後の両脳領域において酸化ストレスマーカーである 4-hydroxynonenal レベルが増加していたが、エダラボン投与により抑制されていた。さらにこの 4-hydroxynonenal の増加は脳振とう受傷直後の NADPH oxidase 阻害剤投与でも抑制されていたことから、活性酸素産生酵素 NADPH oxidase が脳振とう後の酸化ストレスに関与していることが明らかになった。また、脳振とう受傷マウス脳内の炎症反応を検討したところ、コントロール(非脳振とう)群の海馬において観察された GFAP 陽性細胞内 5-lipoxygenase の細胞質分布が脳振とう群では核膜周辺に変化しており、エダラボン投与によって核膜周辺への集積が抑制されていた(図3)。脳振とう受傷後に 5-lipoxygenase 阻害剤を投与したマウスではうつ病様行動が阻止されることも強制水泳試験により明らかになった。炎症関連酵素である 5-lipoxygenase は、酸化ストレスによって活性化され核膜のリン脂質を基質としてロイコトリエンを産生することがよく知られており、5-lipoxygenase の遺伝子欠損マウスはストレス負荷によるうつ病様行動が惹起されないことも報告されている。以上の検討から、報告者らは脳卒中治療薬エダラボンが脳振とう後に惹起されるうつ病を阻止することを明らかにし、その機序としてエダラボンによる NADPH oxidase を介した酸化ストレスの抑制と海馬アストロサイトにおける 5-lipoxygenase の核膜周辺への集積の抑制が関与していることを見出した。今回の結果は、エダラボンが脳振とう後のうつ病発症の予防薬として有望であることを示唆する基礎資料として極めて重要な成果であり、さらに現在まで不明であった脳振とう後のうつ病発症分子メカニズムを明らかにしたことで医学的のみならず神経科学的にも意義深い成果である。

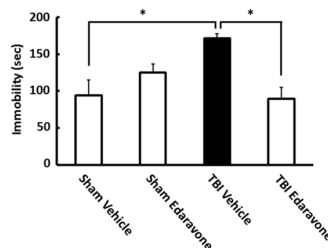


図2 脳振とう誘発性うつ病発症に対するエダラボンの効果。

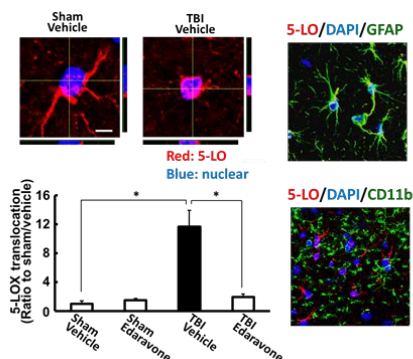


図3 脳振とうによる 5-lipoxygenase の細胞内局在変化とエダラボンの効果。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 9 件)

Shimizu T, Tanaka K, Shimizu S, Higashi Y, Yawata T, Nakamura K, Taniuchi K, Ueba T, Yuri K, Saito M., Possible inhibitory role of endogenous 2-arachidonoylglycerol as an endocannabinoid in (\pm)-epibatidine-induced activation of central adrenomedullary outflow in the rat. *Neuropharmacol.* (2015) 95:278-289. (査読有)
DOI:10.1016/j.neuropharm.2015.03.034.

Nonaka M, Yawata T, Takemura M, Higashi Y, Nakai E, Shimizu K, Ueba T., Elevated cell invasion in a tumor sphere culture of RSV-M mouse glioma cells. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. (2015) 55:60-70. (査読有)
DOI:10.2176/nmc.oa.2014-0067.

Nakamura K, Shimizu T, Yanagita T, Nemoto T, Taniuchi K, Shimizu S, Dimitriadis F, Yawata T, Higashi Y, Ueba T, Saito M., Angiotensin II acting on brain AT1 receptors induces adrenaline secretion and pressor responses in the rat. *Sci Rep.* (2014) 4:7248. (査読有)
DOI:10.1038/srep07248.

Higashi Y, Hoshijima M, Yawata T, Nobumoto A, Tsuda M, Shimizu T, Saito M, Ueba T., Suppression of oxidative stress and 5-lipoxygenase activation by edaravone improves depressive-like behavior after concussion. *J Neurotrauma.* (2014) 31:1689-99. (査読有)
DOI:10.1089/neu.2014.3331.

Shimizu T, Tanaka K, Nakamura K,

Taniuchi K, Yawata T, Higashi Y, Ueba T, Dimitriadis F, Shimizu S, Yokotani K, Saito M., Possible involvement of brain prostaglandin E2 and prostanoid EP3 receptors in prostaglandin E2 glycerol ester-induced activation of central sympathetic outflow in the rat. *Neuropharmacology.* (2014) 82:19-27. (査読有)
DOI:10.1016/j.neuropharm.2014.03.005.

Tanaka K, Shimizu T, Higashi Y, Nakamura K, Taniuchi K, Dimitriadis F, Shimizu S, Yokotani K, Saito M., Central bombesin possibly induces S-nitrosylation of cyclooxygenase-1 in pre-sympathetic neurons of rat hypothalamic paraventricular nucleus. *Life Sci.* (2014) 100:85-96. (査読有)
DOI:10.1016/j.lfs.2014.01.079.

Asanuma M, Miyazaki I, Diaz-Corrales FJ, Higashi Y, Namba M, Ogawa N., Transplantation of melanocytes obtained from the skin ameliorates apomorphine-induced abnormal behavior in rodent hemi-parkinsonian models. *PLoS One.* (2013) 8:e65983. (査読有)
DOI:10.1371/journal.pone.0065983.

Okuda H, Nishida K, Higashi Y, Nagasawa K., NAD(+) influx through connexin hemichannels prevents poly(ADP-ribose)polymerase-mediated astrocyte death. *Life Sci.* (2013) 92:808-14. (査読有)
DOI:10.1016/j.lfs.2013.02.010.

Ohta M, Higashi Y, Yawata T, Kitahara M, Nobumoto A, Ishida E, Tsuda M, Fujimoto Y, Shimizu K., Attenuation of axonal injury and oxidative stress by edaravone protects against cognitive impairments after traumatic brain injury. *Brain Res.* (2013) 15:184-92. (査読有)
DOI:10.1016/j.brainres.2012.09.011.

[学会発表](計 7 件)

東 洋一郎, 亜鉛誘導活性化ミクログリアの機能解析、第 4 回メタロミクス研究フォーラム、2014 年 11 月 7 日～2014 年 11 月 8 日、武蔵野大学(東京都西東京市)

東 洋一郎, Suppression of oxidative stress and 5-lipoxygenase activation by edaravone improves depressive-like behavior after concussion. 第 57 回日本神経化学会、2014 年 9 月 29 日～2014 年 10 月 1 日、奈良県文化会館(奈良県奈良市)

東 洋一郎、頭部外傷後のうつ病様行動に対するエダラボンの効果の解析、第 134 回日本薬学会年会、2014 年 3 月 27 ~ 2014 年 3 月 30 日、熊本大学（熊本県熊本市）

東 洋一郎、頭部外傷後のうつ病様行動に対するエダラボンの効果の解析、第 14 回日本分子脳神経外科学会、2013 年 10 月 18 日 ~ 2013 年 10 月 19 日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

東 洋一郎、頭部外傷後うつ病発症に対する脳内亜鉛の関与、第 9 回メタルバイオサイエンス研究会、2013 年 9 月 26 日 ~ 2013 年 9 月 27 日、静岡県立大学（静岡県静岡市）

東 洋一郎、エダラボンは頭部外傷による軸索損傷を阻止し記憶障害を改善する、第 36 回日本神経化学大会、2013 年 6 月 20 日 ~ 2013 年 6 月 23 日、国立京都国際会館（京都）

東 洋一郎、Attenuation of axonal injury and oxidative stress by edaravone protects against cognitive impairments after traumatic brain injury. 第 35 回日本神経科学大会、2012 年 9 月 18 日 ~ 2012 年 9 月 21 日、名古屋国際会議場（愛知県名古屋市）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東 洋一郎 (HIGASHI, Youichirou)
高知大学・教育研究部医療学系・助教
研究者番号：80380062

(2) 研究分担者

八幡 俊男 (YAWATA, Toshio)
高知大学・教育研究部医療学系・助教
研究者番号：40380323

上羽 哲也 (UEBA, Tetsuya)
高知大学・教育研究部医療学系・教授
研究者番号：00314203
(H25-26 年度)

藤本 康倫 (FUJIMOTO, Yasunori)
高知大学・教育研究部医療学系・講師
研究者番号：80589789
(H24 年度)

清水 恵司 (SHIMIZU, Keiji)
高知大学・教育研究部医療学系・教授
研究者番号：70116044
(H24 年度)