

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791208

研究課題名（和文）大うつ病におけるアリピプラゾールによる増強療法の分子機序

研究課題名（英文）Molecular mechanisms underlying augmentation therapy with aripiprazole for major depression

研究代表者

小杉 桜子 (Kosugi, Sakurako)

金沢大学・医学系・博士研究員

研究者番号：50517810

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円、（間接経費） 960,000 円

研究成果の概要（和文）：①慢性ストレス負荷後の動物に、生食、SSRI あるいはアリピプラゾールを慢性投与した後、側坐核の興奮性シナプス関連タンパク質に対する影響について検討したところ、2つの薬剤は全く異なる作用を有することが確認された。②対照動物のドーパミン依存性行動の個体差を知る目的にて、意欲ならびにコスト/利益バランスに応じた意思決定の個体差に基づく亜群分けを試みたところ、大きく4つの亜群に分けられた。さらに慢性ストレス負荷後にそれぞれの亜群が異なるストレス誘導性の表現型を示した。従って、ストレス負荷後のうつ病様表現型の発現は、病前の個体差に大きく依存し、そこからストレス負荷後の反応も予測できることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：We found that SSRI and dopamine partial agonist aripiprazole have distinct effects on the regulations of synaptic proteins in the rat nucleus accumbens after chronic stress. To investigate if we could predict the responses to chronic unpredictable stress of each individual based on the pre-stress individual differences, we next aimed to classify several subgroups from naive rats based on their performance of food-instrumental training with progressive ratio schedule. We succeeded to classify 4 from a group of original naive into 4 subgroups that represent distinctive response in motivation or reactions in cost/benefit decision-making. In addition, each 4 subgroups demonstrated distinct phenotypes after 3-weeks chronic unpredictable stress. These data implicate that the phenotypes induced after chronic stress in rats largely depend on individual differences that exist at pre-stress stages, and it would be possible to predict the responses to stress of each by taking advantage of it.

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：うつ病 動物モデル 個体差 意欲 ドーパミン 意思決定

1. 研究開始当初の背景

大うつ病を含む気分障害の罹病患者数は、現在国内で100万人を超えている。大うつ病の薬物治療においては、セロトニン選択性再取り込み阻害薬 (SSRI)、あるいはセロトニン・ノルアドレナリン選択性再取り込み阻害薬 (SNRI) が第一選択とされる。しかしながら、SSRI や SNRI の単剤療法に反応しない患者も少なくない。その理由として、意欲や快感に関係するドーパミンを治療標的とせず、セロトニンもしくはノルアドレナリンにターゲットを限定した薬物療法の限界性が指摘されている。そのため、SSRI あるいは SNRI に気分安定薬や非定型抗精神病薬、ドーパミン作動薬を組み合わせた増強療法が推奨されている。特に欧米でも有効性が確認されている治療法の一つが、ドーパミン部分作動薬であるアリピプラゾールによる増強療法である。しかしアリピプラゾールによる増強療法が脳のどの部位で、どのような分子機序を介して効果を発現しているかは、これまで殆ど解明されていなかった。

2. 研究の目的

大うつ病の動物モデルを用い、アリピプラゾールの作用部位の一つと考えられる側坐核に着目し、アリピプラゾールによる増強療法の分子レベルでの作用機序と、側坐核の大うつ病病態への関与機序について解明を目指す。また、大うつ病ではSSRIのみで寛解を得られる患者群と、SSRIでは不完全寛解にしか至らない患者群が存在することから、ストレス負荷前のドーパミン関連性行動指標の個体差をもとに動物を亜群分けし、それぞれの群のストレス反応性およびSSRI あるいはアリピプラゾールに対する反応性を検証することで、アリピプラゾールによる増強療法の適応となる亜群およびうつ病様表現型を明らかにする。

3. 研究の方法

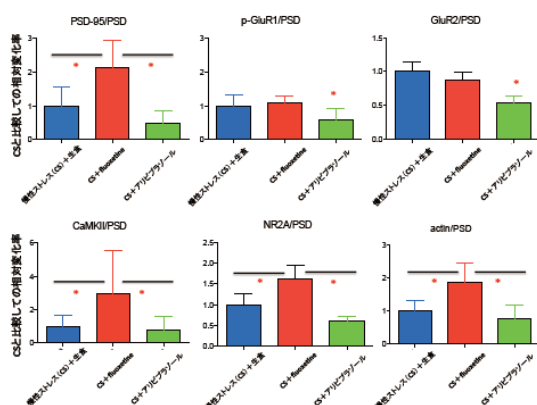
(1)慢性ストレス負荷後の動物に、SSRI とアリピプラゾールを同時に投与し、対照群および単剤投与群とシナプスタンパク質のプロファイルと比較する (平成 24 年度)。
(2)対照動物のドーパミン (=意欲) 依存性行動のベースラインを知る目的にて、レバー押し訓練による食餌獲得課題を行い、予め意欲の個体差が存在しているかを検証する。同時に血清コルチゾールのベースラインと急性電撃ショック負荷時の変動について各被験体について検証し、意欲と血清コルチゾールの関係について明らかにする (平成 24 年度)。
(3)前年度の結果に基づき、ストレス負荷前に予め意欲の高中低について確認し、グループ分けを行った動物群に慢性の予測不能

ストレス (chronic unpredictable stress=CUS; 拘束ストレス、侵入者ストレス、強制水泳の3つのストレスの連日のランダムな負荷) を4週間負荷した群と、対照実験としてハンドリングのみ供した軍を用意し、それぞれの群において、CUS 負荷後の4週間の間に、どのような表現型が出現したか検証し、CUS 負荷前の個体差と、ストレス負荷後の表現型の関係について明らかにする (平成 25 年度)。

(4)最後に、(3)にて CUS 負荷前に亜群分けしたそれぞれの動物群について、CUS 負荷の直後より a)溶媒、b)代表的な SSRI である escitalopram (10mg/kg, i.p.)、c) escitalopram +アリピプラゾール (0.5, 1, 3mg/kg, i.p.)を3週間連日投与し、その後 a, b, c の3条件を比較検討し、SSRI 反応性の表現型、SSRI 非反応性の表現型、SSRI+アリピプラゾールで反応性の表現型、SSRI+アリピプラゾールで非反応性の表現型を明らかにする (平成 25 年度)。

4. 研究成果

(1)慢性ストレス負荷後の動物に、生食、代表的 SSRI である fluoxetine (10mg/kg, i.p.) あるいはアリピプラゾール (5mg/kg, i.p.) をそれぞれ2週間連続投与した後動物脳を取り出し、側坐核のタンパク質を細胞分画して、シナプス分画を精製し、そこに含まれる代表的な興奮性シナプス関連タンパク質に対する SSRI あるいはアリピプラゾールに対する影響について検討した (Fig.1)。



その結果、fluoxetine とアリピプラゾールは、慢性ストレス負荷後の側坐核シナプス分画の興奮性シナプス関連タンパク質に対して、全く異なる作用を有することが確認された。例えば、fluoxetine は、PSD-95 や CaMKII、NR2A、actin を有意に増加させるが、このような作用はアリピプラゾールには確認されなかった。一方、アリピプラゾールは GluR2、p-GluR2 を減少されたが、fluoxetine にはこのような作用は認められなかった。アリピプラゾールは小量ではドーパミンアゴニスト、それ以上ではアンタゴニストとして作用する

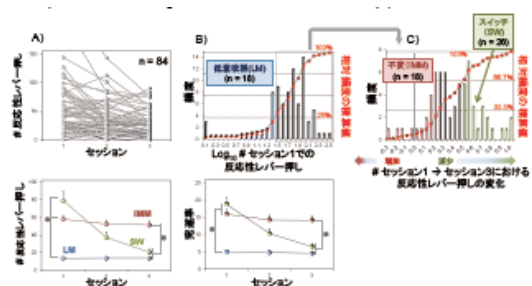
と考えられ、最近ではヒトうつ病治療に対するアリピプラゾールは、極少量の投与の方が治療効果が得られやすいとされている。今回のアリピプラゾールの投与量は少量とはいえないため、今後少量での検討も必要と考えられる。

(2)対照動物のドーパミン(=意欲)依存性行動の個体差を知る目的にて、計84匹のラットを用い、レバー押し訓練による食餌獲得課題を利用した意欲の個体差の検出と亜群分類分けを試みた。まず、行動実験パラダイムは以下の通りである(Fig2)。

Fig.1 行動実験パラダイム

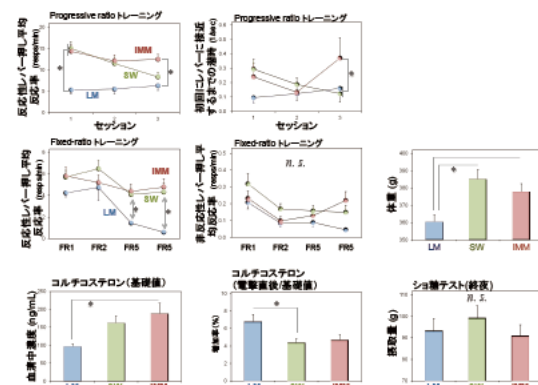


まず、progressive ratio セッション1回目の結果から、餌を獲得出来る反応性レバー押しを全く学習しない動物(N=18)を区別し、低意欲群(low motivation=LW)とした。続いて餌がフリーでもらえる条件下で、レバー押しで餌が獲得できるためのレバー押しの条件を次第にきつくる progressive ratio セッションを行った。この条件下では動物は敢えてレバー押しをしなくても餌を得ることが可能のため、レバー押しが習慣化(=コスト/利益の変化に関係なく、学習した行動を継続する状態)した動物以外は、レバー押しを続ける必然性は存在しない(=コスト/利益の変化に応じた柔軟な行動変化)。progressive ratio セッション1から3にかけての相対頻度の積算値を元に、特に強くレバー押しを減少させていった動物群をスイッチ群(Switchable=SW:N=26)、反対にレバー押しの回数に殆ど変化を認めなかった動物群を不変群(immobile=IMM)とし、計4つの群に分けた(Fig3)。

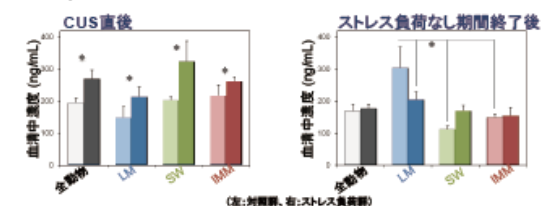


このうち、LM, SW, IMMの3群に関して、特に正規分布から外れた行動傾向を示していると考えられ、他の行動指標でも群間で有意な違いを認めた他、LMは体重が有意に低く、また血清コルチコステロンの基礎値が他の2群に比べて有意に低く、かつ電撃ショック後の上昇率が有意に高いことが確認され、ストレスに対する内在性のメカニズムが異なる

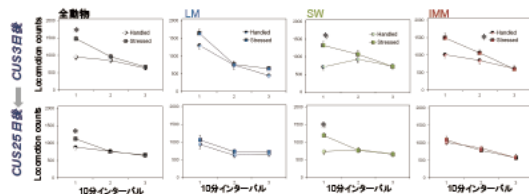
ことが示唆された(Fig4)。



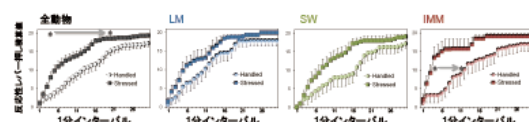
(3) (2)の結果に基づき、LM, SW, IMMの3グループに CUS を負荷し、負荷直後およびそれから数週間の行動指標への影響の違いについて検討を行った。まず、ストレス負荷の指標となる血清コルチコステロン値だが、CUS 終了直後には全亜群で上昇が認められた。一方、それから3週後には LM 群のみで持続的な上昇が確認された(Fig5)。



CUS 後の行動指標の変化について各亜群について検討したところ、新規環境下での移所運動量は CUS 直後には SW, IMM 群で有意な増加を認めたが、CUS3 週後には SW 群のみで継続した増加を認めた(Fig6)。

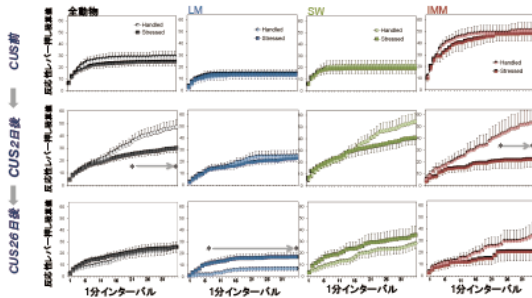


また CUS 直後では、fixed-schedule でのレバー押しに関して、IMM 群でのみ有意な増加を認めたが、CUS3 週後には対照群との違いはなくなっている(Fig7)。



最後に、CUS 後に再度 progressive-ratio セッションを行った。この時点ではセッションを重ねるたびにレバー押しが低下して行くことが期待される。IMM 群では、CUS 直後に対照群に比べて有意にレバー押しが低下した。

一方、LW 群では奇妙なことにストレス負荷を受けた動物で CUS 終了 26 日後にレバー押しが増加していた。この時点でのレバー押しは合目的性を有しておらず、非常に奇妙な行動と言える。SW 群では対照群とストレス負荷群の間に特に違いを認めなかった (Fig8)。



以上の結果をまとめると、以下ようになる (Fig9)。

	低意欲群 (LM) progressive ratio 訓練の関 連意欲状態が持続	ストレス群 (SW) コスト利益の変化に伴い 運動に行動を変化	不安群 (IMM) コスト利益の変化に応じた 行動修正が乏しい
CUS 前状態	• FR1 and FR2 は正常反応だが、FR5 や FR6 低下 • 血漿コルチコステロンの基礎値が高い 一方、電撃ショックで過剰反応 • 食欲低下		• 衝動的なレバー押し (遅延が短い)
CUS 直後	• 血漿コルチコステロンの基礎値上昇	• 血漿コルチコステロンの基礎値上昇 • 新規学習反応の増加	• 血漿コルチコステロンの基礎値上昇 • 新規学習反応の増加 • 電撃ショックの影響が弱 コスト利益の変化に応じた 行動修正の改善
CUS3-4 日後	• コスト利益の変化に応じた 行動修正が持続	• 新規学習反応の増加	

当初の予想通り、ストレス負荷前の個体差によって、ストレス負荷後の表現型の変化も異なる (予測できる) ことが明らかとなった。さらにこれまでの大うつ病動物モデルでは見つからなかった異常な表現系の存在を明らかにすることにも成功した。この結果はうつ病病前の heterogeneity を強く示唆するものであり、今後のうつ病の病態メカニズム解明および治療法の解明、及び治療薬の評価系に多大な影響を与える成果と考えられる。上記結果については近日中に投稿予定である。(4) (3)の結果に基づき、CUS 負荷前に亜群分けしたそれぞれの動物群について、CUS 負荷の直後より a) 溶媒、b) escitalopram、c) escitalopram + アリピプラゾールを 3 週間連日投与する実験を計画していたが、(3)の実験が予定以上に手間取ったこと、また研究代表者が都合により平成 25 年 12 月にて所属研究施設を異動したことなどにより、実施が困難となり、SSRI の投与実験は開始していたが、研究計画は(3)までで一旦終了とした。今後は前所属機関で当時の研究協力者らが継続して行く予定である。

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 0 件)

〔学会発表〕 (計 9 件)

1. Y Iguchi, S Kosugi, Z Lin, Y Minabe, S

Toda. Effect of repeated oxidative stress administration on cocaine-induced sensitization and glutathione homeostasis in the rat striatal subregions. 新学術領域「マイクロ精神病態」班会議、若手研究交流会、磯辺ガーデン、群馬、2.13-2.14, 2014

2. S Toda, Y Iguchi, S Kosugi, Z Lin, Y Minabe. Temporal and persistent effects of mild oxidative stress on motivational and cognitive functions in adult rats. Annual meeting of Society for Neuroscience, コンベンションセンター、San Diego, USA, 11.9-11.13, 2013

3. Y Iguchi, S Kosugi, Y Minabe, S Toda. Individual differences in pre-stress state predict responses to chronic unpredictable stress in rats. Annual meeting of Society for Neuroscience, コンベンションセンター、San Diego, USA, 11.9-11.13, 2013.

4. 戸田重誠、小杉桜子、井口善生、林子喬、三邊義雄 マイルドな酸化ストレスがラット線条体が関与する意思決定およびコカイン誘発性行動に与える影響 平成 25 年度アルコール薬物依存関連学会合同学術総会、岡山コンベンションセンター、10.4-10.5, 2013.

5. Y Iguchi, S Kosugi, Y Minabe, S Toda. Individual differences in the performance of an instrumental behavior of naïve rats predict distinctive responses to chronic unpredictable stress. 新学術領域「マイクロ精神病態」班会議、名古屋ガーデンパレス、8.28-8.30.2013.

6. S Toda, S Kosugi, Y Iguchi, Y Minabe. 急性あるいは慢性のマイルドな酸化ストレスがラットの道具学習、脱価値化、及びコカイン誘発性行動感作に与える影響、新学術領域「マイクロ精神病態」班会議、名古屋ガーデンパレス、8.28-8.30.2013.

7. S Toda, S Kosugi, Y Iguchi, Y Minabe. Dissociable effect of a glutathione synthesis inhibitor on locomotor activity and stereotypy of cocaine sensitization. 日本神経科学学会大会、京都国際会議場、6.20-6.23, 2013.

8. Y Iguchi, S Kosugi, Y Minabe, S Toda. Individual differences in instrumental performance in naïve rats predict different responses to chronic stress. 日本神経科学学会大会、京都国際会議場、6.20-6.23, 2013.

9. Y Iguchi, S Kosugi, Y Minabe, S Toda. Cocaine differently affects redox status in the rat nucleus accumbens and dorsal striatum. 日本神経科学学会大会、名古屋国際会議場、9.18-9.21, 2012.

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小杉 桜子 (Kosugi, Sakurako)
金沢大学・医学系・博士研究員
研究者番号：50517810

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：