

平成 30 年 5 月 29 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26430062

研究課題名(和文) 糖尿病態に好発するうつ病の分子病態メカニズムと速やかに臨床応用可能な治療法の解明

研究課題名(英文) Effect of experimental diabetes on the emotional disability and their biological mechanisms.

研究代表者

宮田 茂雄 (Miyata, Shigeo)

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：40366836

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)：糖尿病患者のうつ病罹患率は高いことが知られているが、そのメカニズムは解明されていない。そこで本研究では、情動調節機能および脳組織中の代謝物プロフィールに与える糖尿病の影響について検討した。糖尿病マウスの体重は減少しており、血糖値は上昇していた。糖尿病マウスは情動行動と脳組織中の代謝物含有量に明らかな異常を認め、インスリンの処置により改善された。また、こうした異常と関連する生物学的パスウェイとして栄養因子受容体を介するシグナリングカスケードを同定した。以上のことから、糖尿病態下の脳組織では代謝物プロフィールが変化したことにより情動調節機能に障害が生じる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：There are increasing evidence that patients with diabetic mellitus (DM) have a higher prevalence to major depressive disorder than the general population; however, the biological mechanisms are still unclear. Here, we examined the effect of experimental DM on the emotional function and the metabolites profile in the brain in mice. DM mice exhibited the higher levels of blood glucose and the lower body weights. DM mice showed the abnormal behaviors. The brain metabolite levels were also altered in DM mice. The treatment with insulin dose-dependently and significantly improved these abnormalities. We found that the trophic factor receptor-mediated signaling was a candidate associated with the emotional disability in DM mice. Overall, we suggest the possibility that DM affects the emotional function mediated, at least in part, by disrupting the regulation the metabolites-associated signaling.

研究分野：神経科学、精神薬理学

キーワード：糖尿病 うつ病 モデル動物 情動行動

## 1. 研究開始当初の背景

糖尿病はうつ病発症率を高める重大な危険因子として知られている<sup>1, 2)</sup>。糖尿病患者にうつ病が併発することで規則正しい血糖コントロールが困難となり、低血糖エピソード数や糖尿病合併症発症率が増加することが報告されている<sup>3)</sup>。これらのことから、糖尿病がうつ病を引き起こす分子病態メカニズムを明らかにし、有効な治療法や予防法を確立することが重要である。

我々はこれまでに、糖尿病モデルマウスには明らかな情動行動異常(うつ様行動を含む)が認められること<sup>4, 5)</sup>、うつ症状と関連の深い内側前頭前皮質において、糖尿病モデルマウスは対照群と比較して心理的ストレス刺激により遊離されるセロトニン量が著しく少ないこと<sup>6)</sup>、および、上記の機能異常は、血糖値を下げない低用量のインスリン処置でも十分に改善できること<sup>6)</sup>、を報告した。これらのことから、我々は、糖尿病による情動行動異常とセロトニン神経機能異常は、持続的な高血糖状態よりもむしろインスリン反応の減弱化により引き起こされると考えている。

近年、培養神経細胞を用いた研究において、インスリンが PI3K/Akt/mTOR 経路および Rac1 経路を介して突起伸展とスパイン形成を促すことが報告された<sup>7)</sup>。糖尿病のようなインスリン反応性低下状態では、セロトニン神経の神経線維密度やシナプス数、神経細胞数、神経連絡などが異常を来していると推察し、これが糖尿病態にうつ病が好発する原因の1つと考えた。また、この異常は低用量インスリンの処置によって改善すると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、糖尿病により誘発されるセロトニン神経機能異常の分子病態メカニズムを解明し、糖尿病態下で好発するうつ病の原因について考察する。また、上記の機能異常に対する低用量インスリンの改善効果のメカニズムを解明する。さらに、糖尿病態下の脳における代謝物の網羅的解析(メタボロミクス)を行い、糖尿病態ならびにインスリンの効果と関連する生物学的パスウェイを解明する。

## 3. 研究の方法

### 3. 1. 実験動物

実験には4週齢の雄性ICRマウス(チャールズリバー社)を使用した。Streptozotocin (STZ; 200 mg/kg) を尾側静脈内投与することにより糖尿病を誘発した。なお、生理食塩液を同様に投与したマウスを健常対照群とした。STZ投与から4日後にマウスの体重および血糖値を測定した。STZ処置群のうち、血糖値が350mg/dL以上である個体を糖尿病モデルと判定し、血糖値が350mg/dLに満たない個体はその後の実験から除外した。STZ投与群を3グループに分割し、それぞれの群

に高用量のインスリンペレット(H-Ins群)、低用量のインスリンペレット(L-Ins群)およびコントロールペレット(DM群)を背部皮下へ挿入した。健常対照群にはコントロールペレットのみを挿入した(HC群)。この処置から1週間後に再び体重と血糖値を測定した。その翌日から、以下の行動実験を行った。

### 3. 2. 自発運動量

マウスの自発運動量を赤外線センサー(Activity sensor system; O'HARA & Co., Ltd)により解析した。マウスを専用の測定ケージに入れ、その直後から測定を開始した。測定時間は120分間とし、120分間中の総運動量を算出した。

### 3. 3. 尾懸垂試験

マウスのうつ様行動は尾懸垂試験(O'HARA & Co. Ltd)により解析した。測定時間は6分間とし、6分間中にマウスが無動であった時間を算出した。

### 3. 4. 免疫組織学的染色法

マウスをホルマリンにより灌流固定し、採取した脳組織をホルマリン液に浸して4日追加固定した。ピプラトームを用いて大脳皮質の50um冠状スライスを作製した。抗セロトニントランスポーター(SERT)抗体により、セロトニン神経線維を免疫染色した。

### 3. 5. メタボローム解析

マウスを断頭後に前頭葉皮質(FCx)および海馬(Hip)を採取し、組織ホモジネートを作製した。遠心分離して組織片を除去し、上清中に含まれる代謝物量についてメタボローム解析を行った。

### 3. 6. バイオインフォマティクス

Ingenuity Pathway Analysis (IPA)により、糖尿病による影響が認められた代謝物群と関連性のある生物学的なパスウェイの検索を行った。

## 4. 研究成果

STZ処置4日後の時点において、STZ処置群は溶媒処置群と比べて有意な体重減少と血糖上昇を認めた。インスリンの処置により、血糖値は用量依存かつ有意に低下し、H-Ins群の血糖値はHC群とほぼ同程度であった。インスリンの処置により、L-Ins群およびH-Ins群の体重は有意に増加した(図1)。大脳皮質および海馬を含む脳薄切片を作製し、抗SERT抗体を用いた免疫染色を行った。その結果、HC群とDM群の間に差を認めなかった。我々は、DM群がHC群と比較して心理的ストレス負荷によるセロトニン遊離量が少ないことを報告している<sup>6)</sup>。したがって、DM群に認められるセロトニン神経の機能異常は、セロトニン神経の病理学的変化に起因するものではなく、セロトニン遊離

システムなどの機能的な変化によるものと考えられた。

マウスの自発運動量を測定したところ、DM 群の自発運動量は HC 群と比べて有意に多かった。この結果は過去の報告と一致するものであった<sup>8)</sup>。インスリン処置により、STZ 処置マウスの自発運動量は用量依存的かつ有意に低下し、H-ins 群の自発運動量は HC 群とほぼ同程度であった。尾懸垂試験を行ったところ、DM 群の無動時間は HC 群と比べて有意に増加しており、この結果は過去の報告と一致するものであった<sup>4,5)</sup>。L-ins 群および H-ins 群の無動時間は DM 群と比べて有意に減少しており、HC 群とほぼ同程度であった。これらのことから、DM 群はうつ様行動を呈しており、インスリン処置により改善することが明らかとなった。また、血糖値を中等度に低下させる低用量のインスリン (L-Ins) 処置でも十分な抗うつ様効果が確認された。

尾懸垂試験を行った翌日にマウスの FCx および Hip を採取し、組織中に含まれる代謝物量についてメタボローム解析を行った。その結果、FCx において 15 種類の代謝物について有意な群間差を認めた。また、尾懸垂試験において各個体が呈した無動時間と、FCx におけるこれら 15 種類の代謝物含有量は、統計学的に有意な相関関係を認めた。一方、Hip においては 3 種類の代謝物について有意な群間差を認め、尾懸垂試験における無動時間と有意な相関関係を認めた。主成分分析の結果、FCx において HC 群と DM 群との間に明確な代謝物パターンの差異を認めた。L-Ins 群ならびに H-Ins 群は、HC 群と近い代謝物パターンを呈した。一方、Hip においては各群の代謝物パターンに差異を認めなかった (図 2)。これらのことから、DM 群で認められる脳組織中の代謝物パターンの異常はインスリンの処置により改善することが明らかとなった。

DM 群の FCx において含有量の変化を認めた 15 種類の代謝物と関連する生物学的なパスウェイについて IPA により解析を行った。その結果、栄養因子受容体を介したシグナリングカスケードが有意差最上位であった。このことから、DM 群の FCx においては栄養因子受容体を介したシグナリングカスケードに異常が生じている可能性が示唆された。

以上のことから、糖尿病による情動機能の変化には、FCx および Hip における代謝物パターンの変化が一部関与している可能性が示唆された。また、これら代謝物パターンの変化は、栄養因子受容体シグナルと密接な関係にある可能性が示唆された。

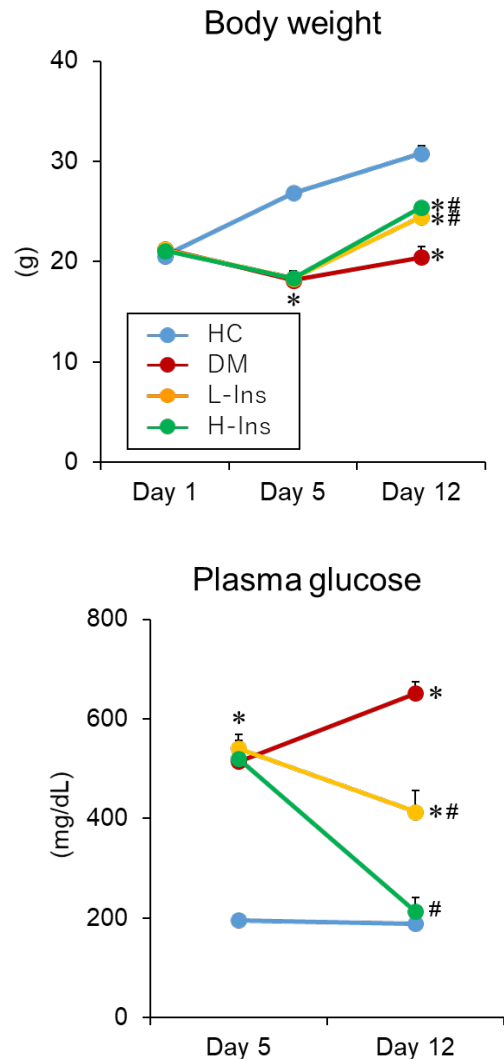
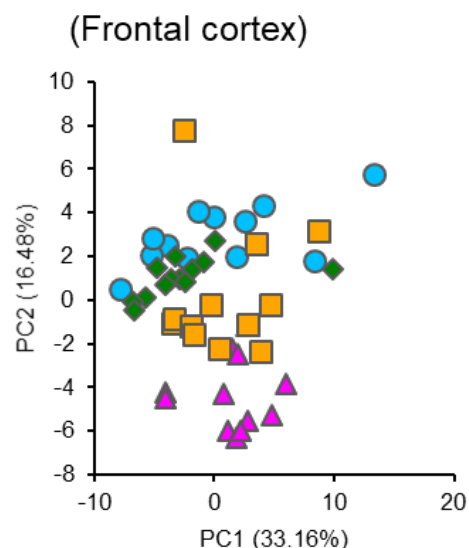


図 1 .STZ 処置後の体重および血糖値の変化  
\* $p < 0.05$  vs. HC. # $p < 0.056$  vs. DM.



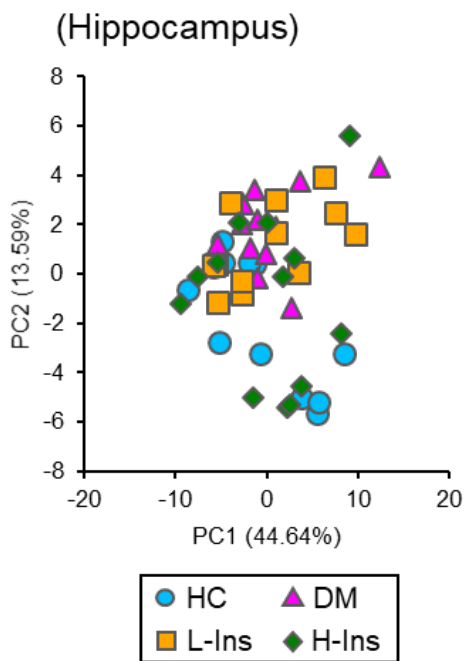


図 2 . 主成分スコア図

< 引用文献 >

- 1) Peyrot M, Rubin RR (1997): Levels and risks of depression and anxiety symptomatology among diabetic adults. *Diabetes Care*, 1997/04/01. 20: 585-590.
- 2) Bădescu S V, Tătaru C, Kobylinska L, Georgescu EL, Zahiu DM, Zăgrean AM, Zăgrean L (2016): The association between Diabetes mellitus and Depression. *J Med Life*. 9: 120-5.
- 3) Roy MS, Roy A, Affouf M (2007): Depression is a risk factor for poor glycemic control and retinopathy in African-Americans with type 1 diabetes. *Psychosom Med*, 69: 537-542.
- 4) Kamei J, Miyata S, Morita K, Saitoh A, Takeda H (2003): Effects of selective serotonin reuptake inhibitors on immobility time in the tail suspension test in streptozotocin-induced diabetic mice. *Pharmacol Biochem Behav.*, 75: 247-254.
- 5) Miyata S, Hirano S, Kamei J (2004): Diabetes attenuates the antidepressant-like effect mediated by the activation of 5-HT1A receptor in the mouse tail suspension test. *Neuropsychopharmacology*, 29: 461-469.
- 6) Miyata S, Yamada N, Hirano S, Tanaka

S, Kamei J (2007): Diabetes attenuates psychological stress-elicited 5-HT secretion in the prefrontal cortex but not in the amygdala of mice. *Brain Res*, 1147: 233-239.

7) Lee CC, Huang CC, Hsu KS (2011): Insulin promotes dendritic spine and synapse formation by the PI3K/Akt/mTOR and Rac1 signaling pathways. *Neuropharmacology*, 61: 867-879.

8) Kamei J, Saitoh A, Iwamoto Y, Funada M, Suzuki T, Misawa M, Nagase H, Kasuya Y (1994): Effects of diabetes on spontaneous locomotor activity in mice. *Neurosci Lett*, 178: 69-72.

5 . 主な発表論文等

該当なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

宮田 茂雄 (MIYATA, Shigeo)

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号 : 4 0 3 6 6 8 3 6