

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19729

研究課題名(和文) ストレスが脳内炎症を介してうつ病を誘発する機序の解明と新たな治療法の開発

研究課題名(英文) Investigating the mechanisms of stress-induced depression via neuroinflammation and development of the new strategy for the treatment of depression.

研究代表者

岩田 正明 (Iwata, Masaaki)

鳥取大学・医学部・准教授

研究者番号：40346367

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：精神疾患の発症に重要な役割を果たしているストレスは、i) 脳内の免疫システムにより感知されて脳内炎症を引き起こすこと、ii) その中心となる分子はNLRP3と呼ばれる細胞内パターン認識受容体であることを突き止めた。ストレス誘発性脳内炎症に基づくうつ病様行動を、NLRP3の生体内抑制物質であるBeta-hydroxybutyrate (BHB) の末梢投与によって改善するか検証を行ったところ、慢性ストレスモデル動物において抗うつ効果を認めること、またストレスによって上昇する脳内のIL-1 濃度を抑制することを示した。今後は脳内炎症仮説に立脚した新規のうつ病治療薬の創出が期待される。

研究成果の概要(英文)：We revealed that i) stress, which plays a critical role in the onset of depression, causes neuroinflammation via the innate immune system in the brain, and that ii) the key molecule which senses stress is a cytosolic pattern recognition receptor called NLRP3. We also demonstrated that beta-hydroxybutyrate (BHB), an endogenous NLRP3 inflammasome inhibitor, showed the antidepressant effects in a rodent model of chronic unpredictable stress, and that BHB attenuated the increased levels of IL-1 in the hippocampus by stress. These findings demonstrate that BHB exerts antidepressant-like effects, possibly by inhibiting NLRP3-induced neuro-inflammation in the hippocampus, and that BHB may be a novel therapeutic candidate for the treatment of stress-related mood disorders.

研究分野：うつ病

キーワード：うつ病 ストレス 炎症 サイトカイン NLRP3 IL-1 TNF

1. 研究開始当初の背景

(1) うつ病患者数の増加と、既存の抗うつ薬の問題点

2013年、厚生労働省は精神疾患を5大疾病の一つと位置づけ、国の医療対策において特に重点を置く方針を示した。中でもストレス社会におけるうつ病患者数の増加と自殺の問題は、大きな社会問題として注目されている。うつ病に対する薬物治療はこれまで様々な工夫がなされてきたが、基本的な薬理作用はこの60年間変わっていない。三環系抗うつ薬、四環系抗うつ薬、SSRI、SNRIなど、より薬理学的にピュアな薬剤が開発されてきたもののモノアミン仮説を超えた創薬は困難であった。近年ではケタミンがうつ病治療に新たな風穴を開けたが、一方で新規抗うつ薬の開発に失敗し市場から撤退・縮小する製薬企業もみられるなど、うつ病治療薬の開発は社会の要求とは裏腹に困難を極めているのが現状である。

(2) 現代ストレス社会に対応した創薬研究

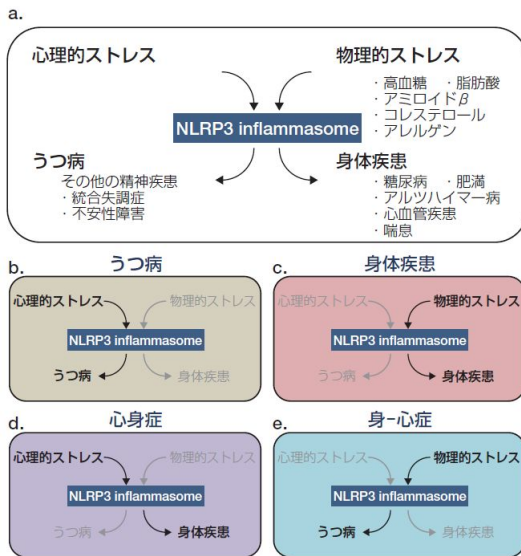
現代の社会構造は複雑化し、ストレス社会はうつ病患者数を著しく増加させている。ここに新たな作用機序を持つ抗うつ薬、特にストレスに起因したうつ病を治療・予防する薬剤を社会に提供することができれば、従来薬で効果を認めない患者を救うことができる可能性がある上に、社会的に大きな損失をもたらす国民病に対し社会・経済的に貢献する可能性を持つ。しかしながら現時点で心理・社会的なストレスがどのようにしてうつ病を引き起こすのか、その生物学的なメカニズムは解明されておらず、ストレス因性のうつ病に対する創薬は進んでいない。今後更に高度・複雑化する社会において、ストレス因性のうつ病をターゲットとした創薬のニーズが益々高まってくるものと思われる。

(3) 臨床から見る「うつ病の炎症仮説」

うつ病患者の血液において炎症性サイトカイン(IL-1 β 、IL-6、TNF α 等)の上昇が以前から報告されてきたが(Howren et al., 2009)、これはうつ病のタイプによっても報告され、難治性うつ病や非定型うつ病において高いことが示された(Lamers et al., 2013)。またストレスが末梢血中の炎症性サイトカインやCRPを上昇させるとも報告され(Steptoe et al., 2007)、更に末梢の炎症性変化は容易に中枢に伝播して脳内のmicrogliaを活性化させることも知られている(Torres-Platas et al., 2014)。直接中枢の変化を捉えた報告もあり、死後脳研究ではうつ病患者において脳内の免疫担当細胞であるmicrogliaの活性化が報告された上(Steiner et al. 2008)、近年PETを用いた研究でうつ病患者の脳でmicrogliaの活性化が示された(Suridjan et al., 2014)。これらの報告から、うつ病の病態の一つとして、microgliaの活性化による脳内炎症により神経が障害されるという「うつ病の炎症仮説」が強く示唆される。

(4) うつ病の NLRP3 インフラマソーム仮説

この「うつ病の炎症仮説」に基づき、我々はそのメカニズムの解明に取り組んでいる。これまでのところストレスが脳内で炎症を引き起こす機序として、ストレスが脳内 ATP 濃度を上昇させ、この ATP が細胞内受容体である NLRP3 に感知されてインフラマソームを形成し、IL-1 β 、および TNF α ・IL-6 を放出させる可能性を報告した。特に NLRP3 が多種多様な危険シグナルを感知する能力を持つことから、NLRP3 がさまざまな環境変化に伴ううつ病発症のメカニズムに寄与している可能性が考えられ、「うつ病の NLRP3 インフラマソーム仮説」を提唱した(下図、Iwata et al., 2013)。



我々の仮説を支持する知見として、慢性ストレスを与えた動物では NLRP3 が活性化され、NLRP3 経路を阻害すると改善すること (Zhang et al., 2015)、また NLRP3 のノックアウトマウスではうつ病様の行動が見られないこと (Ancocer-Gomez et al., 2015) が報告された。またうつ病患者では血中の NLRP3 濃度が高く、回復すると健常者と同程度まで低下することも示された (Ancocer-Gomez et al., 2014)。

2. 研究の目的

そこで現在我々は NLRP3 を直接制御する研究に取り組んでいる。これまで ATP 受容体阻害剤を用いて NLRP3 インフラマソームの活性化制御を試み一定の成果を認めたものの、薬剤の脳内移行率の低さから臨床応用が難しかった。そこで現在、生体内因性の NLRP3 活性化阻害作用のある β ヒドロキシ酪酸 (β -Hydroxybutyric acid: BHB) を用いて NLRP3 インフラマソームの活性化を抑制することでうつ病を予防・治癒する治療法を開発しており、その実用可能性の高さから臨床応用も十分に期待される。本研究ではストレスに応答して過剰に活性化される NLRP3 を、内因性の NLRP3 活性化阻害剤である BHB を用いて制御することにより、脳内炎症の抑制とうつ病様行動の改善が可能となるか検証する。

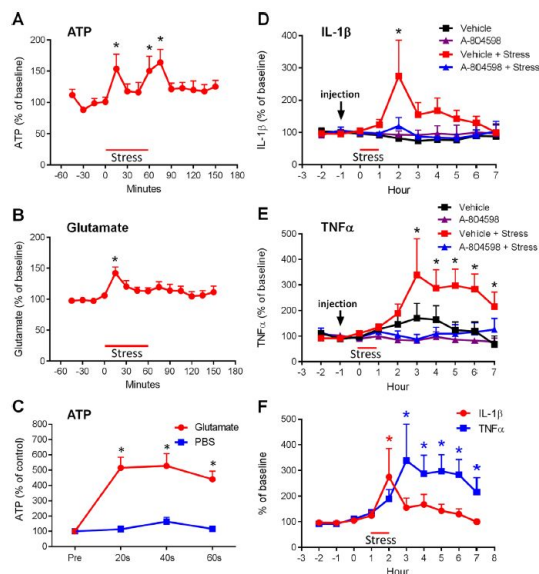
3. 研究の方法

BHB は飢餓時に生体内で産生されるケトン体の一種で、(1) BHB が元来生体内物質であること、(2) 血液脳関門を容易に通過すること、からより臨床応用に適応しやすいものと考えられる。そこで本研究では BHB の末梢投与が抗うつ作用をもつかどうか、その効果と薬理学的メカニズムをストレスモデル動物を用いて検証する。現在までの我々による preliminary な結果では、BHB の末梢投与は抗うつ効果があることが示されている。ただし BHB の末梢投与による具体的な作用部位・機序は不明である。そこでまず、BHB が脳内に移行していることを確認するために末梢投与における脳内 BHB 濃度を測定する。また実際に脳内での NLRP3 の活性化自体を制御しているか確認するため、NLRP3 の活性化を共免疫沈降-ウエスタンブロット法により測定する。さらに BHB が脳内で炎症の制御に作用していることを確認するために、ストレス負荷 ± BHB 投与時の脳内 IL-1 β 濃度を測定する。そして BHB の中枢での直接作用を確認するために、Micro infusion pump システムを用いて BHB を 4 週間にわたって直接側脳室内に投与し、その際の行動変化、および脳内物質の変化を確認する。ただし側脳室内投与では BHB が脳内のどの部位に作用しているのか同定することができない。そのため免疫染色法を用いて、脳内のどの部位に NLRP3 が存在しているのか、またストレス、あるいは BHB の投与により脳内のどの部位で NLRP3 の活性化が変化するのかを検証する。それにより、ストレスによって影響を受けて脳内炎症を起こす部位が同定され、また BHB が主に作用する部位を評価することができるものと考えられる。以上により、BHB が末梢投与でうつ病様行動を改善させること、および BHB が脳内のどの部位で NLRP3 の活性化を抑制し作用しているか確認し、また臨床応用に向けた

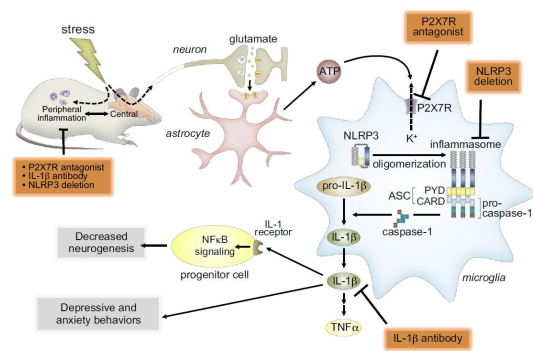
実現可能性について検討する。

4. 研究成果

これまでの研究で我々は、ストレスは脳内で ATP 濃度を上昇させ、NLRP3 に検出されることにより IL-1 β 、IL-6、および TNF α を放出して神経新生障害を引き起こすこと、またうつ病様の行動を誘発することを見出した（下図、Iwata et al., Biol Psychiatry, 2016）。



これに対し、ATP の受容体である P2X7 受容体の阻害薬の投与や、放出された IL-1 β に対する中和抗体の投与がストレス因性のうつ病様行動に対して有効であり、また NLRP3KO マウスはストレスに対して耐性を示した。



また我々はストレス誘発性脳内炎症に基づくうつ病様行動を、NLRP3 の生体内抑制物質である BHB の末梢投与によって改善するか検証を行った。その結果、BHB の末梢投与は脳内の BHB 濃度を上昇させ、慢性ストレ

スモデル動物において抗うつ効果を認めること、また BHB はストレスによって上昇する脳内の IL-1 β 濃度を抑制することを示した。これらの結果および過去の我々の報告により、ストレスは脳内で炎症を惹起することでうつ病様の行動を引き起こし、NLRP3 の活性化を抑制する BHB の投与で改善することが示された。しかし末梢で投与された BHB は末梢で作用しているのか脳内で作用しているのか不明であった。そこで我々は BHB の脳内（側脳室）直接投与と実験を行った。現時点で最終的な結果は得られていないが、脳内への BHB の直接投与（28 日間）は末梢投与と同様に抗うつ効果を持つことが明らかになった。したがって末梢に投与した BHB は脳内で働いて効果を示した可能性があることが示唆された。BHB の有効性は示されたが、臨床応用するにあたり経口投与では BHB は容易に分解されて十分に効果が得られないことが知られている。そこで簡便に体内の BHB 濃度を上昇させる方法として中鎖脂肪酸（medium chain triglyceride: MCT）の経口投与が有効であることを我々は動物実験により確認した。さらに現在 MCT の経口投与により BHB の末梢・中枢投与同様に抗うつ効果が得られか、また脳内の炎症を抑制できるか確認しており、これまでのところ MCT の経口投与は有意な抗うつ効果を示すことが明らかになっている。尚、現在 NLRP3 の脳内活性化部位の同定を引き続き行っている。

先に示したように NLRP3 は多種多様な物質を感知して炎症を引き起こし、炎症関連疾患の発症および悪化に影響を与える非常に critical な細胞内受容体である。また NLRP3 は様々な精神疾患の病態にも関わっているものと考えられ、今後は脳内炎症を抑制することにより中枢性疾患の発症や病態進行を抑えるという、脳内炎症仮説に立脚した新規の治療薬創出を幅広い疾患において検証する。

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4件)

1. **Iwata M**, Ishida H, Kaneko K, Shirayama Y. Learned helplessness activates hippocampal microglia in rats: A potential target for the antidepressant imipramine. *Pharmacol Biochem Behav.* 150-151:138-146. (2016) doi: 10.1016/j.pbb.2016.10.005. (査読有)
2. Wohleb ES, Franklin T, **Iwata M**, Duman RS.: Integrating neuroimmune systems in the neurobiology of depression. *Nat Rev Neurosci* 17:497-511. (2016) doi: 10.1038/nrn.2016.69. (査読有)
3. **Iwata M**, Ota KT, Li XY, Sakaue F, Li N, Dutheil S, Banasr M, Duric V, Yamanashi T, Kaneko K, Rasmussen K, Glasebrook A, Koester A, Song D, Jones KA, Zorn S, Smagin G, Duman RS.: Psychological Stress Activates the Inflammasome via Release of Adenosine Triphosphate and Stimulation of the Purinergic Type 2X7 Receptor. *Biol Psychiatry.* 80:12-22. (2016) doi: 10.1016/j.biopsych.2015.11.026. (査読有)
4. **岩田正明**: うつ病のインフラマソーム仮説. *日本生物学的精神医学会誌.* 27: 96 (2016) (査読無)

〔学会発表〕(計4件)

1. Yamanashi T, **Iwata M**, Tsunetomi K, Kajitani N, Miura A, Duman RS, Kaneko K. Beta-hydroxybutyrate, endogenic NLRP3 inflammasome inhibitor, ameliorates neuro inflammation caused by stress. *Society for Neuroscience 2016.* 2016年11月12日~16日、San Diego (USA).
2. Yamanashi T, **Iwata M**, Kamiya N, Yamauchi T, Duman RS, Kaneko K. NLRP3 inflammasome is activated by psychological

stress: a potential role of NLRP3 inhibitor beta-hydroxybutyrate's antidepressant effect. *Society for Neuroscience 2015.* 2015年10月17日~21日、Chicago (USA).

3. **岩田正明**: うつ病治療の新たなターゲットとしての NLRP3 インフラマソーム. 第38回日本生物学的精神医学会、2016年9月8日~10日、福岡国際会議場(福岡県福岡市)
4. **岩田正明**: ストレスが脳内炎症を介してうつ病を誘発する機序の解明と新たな治療法の開発. 第37回日本生物学的精神医学会、2015年9月24日~26日、タワーホール船堀(東京都江戸川区船堀)

〔図書〕(計1件)

1. **岩田正明**: うつ病の炎症仮説. *Depression Frontier* 2. p77-89. (2016)

6. 研究組織

(1)研究代表者

岩田 正明 (IWATA Masaaki)

鳥取大学・医学部・准教授

研究者番号: 40346367