

令和元年6月12日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10183

研究課題名(和文) うつ病における海馬と扁桃体の統合的理解を目指して

研究課題名(英文) The role of the hippocampus and amygdala in depression

研究代表者

泉剛 (IZUMI, TAKESHI)

北海道医療大学・薬学部・教授

研究者番号：60312360

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：反復拘束ストレスを負荷したラットで、脳内のグルココルチコイド受容体(GR)およびGR阻害因子であるFKBP5を測定した。1日3時間、7日間の拘束ストレス負荷(RS7)により、強制水泳の無動時間が有意に増加した。RS7により血中コルチコステロン基礎値は有意に増加した。RS7によって脳内のGRは不変であったが、扁桃体でFKBP5が有意に増加し、これはSSRIであるシタロプラム(10 mg/kg)の14日間投与で拮抗された。以上より、扁桃体のFKBP5がラットのうつ様行動と関連していることが示唆された。一方、自殺者死後脳の前頭葉でFKBP5が有意に低下しており、FKBP5とうつ病の関係も示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

複数の多型研究でうつ病との相関が報告されているGR阻害因子FKBP5について、うつ病モデルラットの扁桃体で変化を検出した。FKBP5はカルシニューリンの促進因子でもあり、mTOR系を介してオートファジーを調節するなど、多面的な機能を持つことが報告されている。今後、本研究の結果を手がかりとして、HPA系だけでなく、カルシニューリン系、mTOR系やオートファジーとうつ病との関連へ研究を広げ、将来の新規抗うつ薬の開発につなげていきたい。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effect of repeated restraint stress (RS) (3 hr/day) on depression-like behaviors using forced swimming test (FST) in rats. Moreover, we assessed the effect of repeated RS on the serum corticosterone by EIA, and on the GR and FKBP5 (inhibitory factor of GR) in the mPFC, hippocampus and amygdala by Western blotting. We performed above these assessments 2 weeks after repeated stress. Seven times RS significantly increased depression-like behavior, and it was antagonized by previous 14 days repeated administration of escitalopram (10 mg/kg), a SSRI. Serum corticosterone was increased by seven times RS. Protein level of GR was not changed, but that of FKBP5 was increased in the amygdala by seven times RS. Hyperactivity of HPA axis and increased FKBP5 in the amygdala may be related to RS-induced depression-like behavior. Besides, FKBP5 was significantly decreased in the frontal cortex of the suicide completer's postmortem brain sample compared to normal control.

研究分野：精神薬理学

キーワード：うつ病 扁桃体 FKBP5 HPA axis 動物モデル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

うつ病の半数は視床下部-下垂体-副腎 (HPA) 系の機能亢進を示す。HPA 系は、最終産物であるグルココルチコイドによって視床下部と下垂体がネガティブ・フィードバックを受けているほか、上位脳による調節も受けている。破壊や電気刺激実験により、海馬は HPA 系を抑制的に、扁桃体は促進的に調節していることが分かっている。これまでの研究で、慢性ストレスにより海馬が萎縮すること、抗うつ薬による神経新生亢進が海馬で起きることにより、うつ病の責任脳部位として海馬が想定されてきた。一方、不安の中枢である扁桃体は、海馬とは逆に慢性ストレスにより肥大することが報告されており、また、うつ病患者の扁桃体は fMRI で情動刺激に対する過剰反応を示すことが知られている。HPA 系に対する分子レベルでのネガティブ・フィードバックも存在する。FKBP5 はグルココルチコイド受容体 (GR) の阻害因子であり、GR の活性化を妨げるが、GR は FKBP5 の転写を亢進させる。つまり HPA 系が亢進して GR が活性化されると、FKBP5 が増加して GR の過剰な活性化を防ぎ、GR の機能を一定範囲にセットしている。さらに、FKBP5 はカルシニューリンの促進因子でもあり、mTOR 系を介してオートファジーを調節するなど、多面的な機能を有する。近年、多型研究において FKBP5 とうつ病の相関が報告されている。共同研究者の菱本らは自殺既遂者の血液サンプルを用い、FKBP5 の機能的多型と自殺が相関することを報告した。多型研究において、FKBP5 と PTSD の相関も報告されている。特に early life stress の既往によって相関が強まることが判明しており、FKBP5 は個体要因と環境要因の相互作用を規定する因子であると考えられている。

2. 研究の目的

本研究では、慢性ストレス負荷によるうつ病モデルラットにおける血中コルチコステロン基礎値、脳内の GR および FKBP5 を定量した。そして、選択的 5-HT 再取り込み阻害薬 (SSRI) であるエスシタロプラムの慢性投与が脳内 FKBP5 に及ぼす効果について検討した。さらに、自殺者死後脳で FKBP5 を定量した。うつ病は自殺の最大の危険因子であり、自殺者はその原因によらず自殺直前には重度のうつ状態にある。自殺既遂者のサンプルはうつ病の究極の表現型であると言える。本研究により、FKBP5 がうつ病治療のターゲット分子となり得るかを検討し、新規抗うつ薬の開発につなげたい。

3. 研究の方法

7 週齢の雄性 Wistar/ST ラットに 1 日 3 時間の拘束ストレスを 1 日 (RS1 群) または 7 日間 (RS7 群) 負荷し、2 週間後に高架式十字迷路試験と強制水泳試験を施行した。また、同様のストレスを負荷した 2 週間後に、行動試験は行わずに採血と抜脳を行った (10:00 AM)。血中コルチコステロンの基礎値は EIA 法で測定し、内側前頭前野、海馬、扁桃体の GR および FKBP5 を Western blotting で定量した。また、遺伝子多型研究でうつ病との相関が明らかにされている CRH および CRH 受容体 (CRHR1、CRHR2) について定量 PCR によって測定した。さらに、このうつ病モデルラットに対し、SSRI であるエスシタロプラム (ESC) を、拘束ストレス後に 2 週間慢性投与した (10 mg/kg、i.p.)。これにより、ストレスによる行動および脳内 FKBP5 の変化が拮抗されるかどうかを検討した。

共同研究者 (神戸大学) から提供を受けた非自殺者および自殺者サンプルを用い、背外側前頭前野皮質の FKBP5 量を Western blotting で定量し比較した。検体は法医解剖の際に、遺族の同意のもと採取されたものである。提供者が自殺直前にどのような精神状態にあったかは不明であるが、自殺者の多くは抑うつ状態にあり、かつ衝動性・攻撃性亢進をきたしていることが知られており、脳内 FKBP5 量がこれらの精神状態と相関しているかどうかを推測

することができる。

本研究は神戸大学、北海道大学の研究倫理および動物実験倫理委員会の承認により行った。

4. 研究成果

7日間の拘束ストレスを負荷した群 (RS7 群) では、最終ストレスの翌日、1 および 2 週間後において、コントロール群に対して有意な体重の減少が認められた (data not shown)。1 日だけの拘束ストレスを負荷した群 (RS1 群) では有意な体重の減少は認められなかった。高架式十字迷路試験では、RS1 および RS7 群のいずれも、運動量の指標である total count および total distance、不安の指標である open time で、コントロール群との有意な差は認められなかった (data not shown)。強制水泳試験において、RS1 ($P < 0.05$) および RS7 群 ($P < 0.01$) のいずれも、うつ様行動の指標である immobility が有意に増加し、swimming も RS7 群で有意に減少していた ($P < 0.01$) (図 1)。RS7 群の immobility 増加は、最終ストレス負荷から強制水泳試験施行前日までの 14 日間のエスシタロプラム (ESC) 投与によって拮抗された ($P < 0.05$) (図 2)。また、最終ストレスの 2 週間後に、RS7 群の血中コルチコステロン (10:00AM) はコントロール群

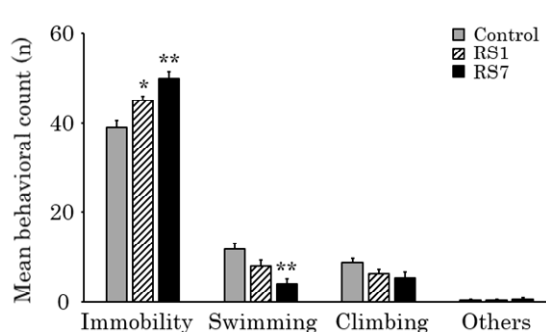


図 1 強制水泳試験に対する拘束ストレスの効果 (n=8-9)

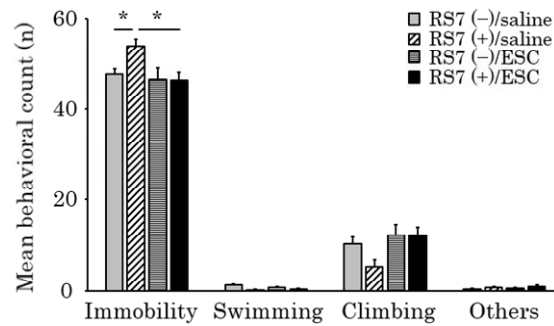


図 2 強制水泳試験に対する拘束ストレスおよびエスシタロプラム (ESC) の効果 (n=8-9)

に対して有意に増加していた (コントロール群, 62.1 ± 5.7 ng/ml; RS1 群, 76.5 ± 5.2 ng/ml; RS7 群, 121.1 ± 13.7 ng/ml, $n=7-8$, $P < 0.01$)。以上より、RS7 群はうつ病モデルとして妥当であると考えられた。最終ストレスの 2 週間後に施行した脳組織の Western blotting では、RS7 群の FKBP5 は扁

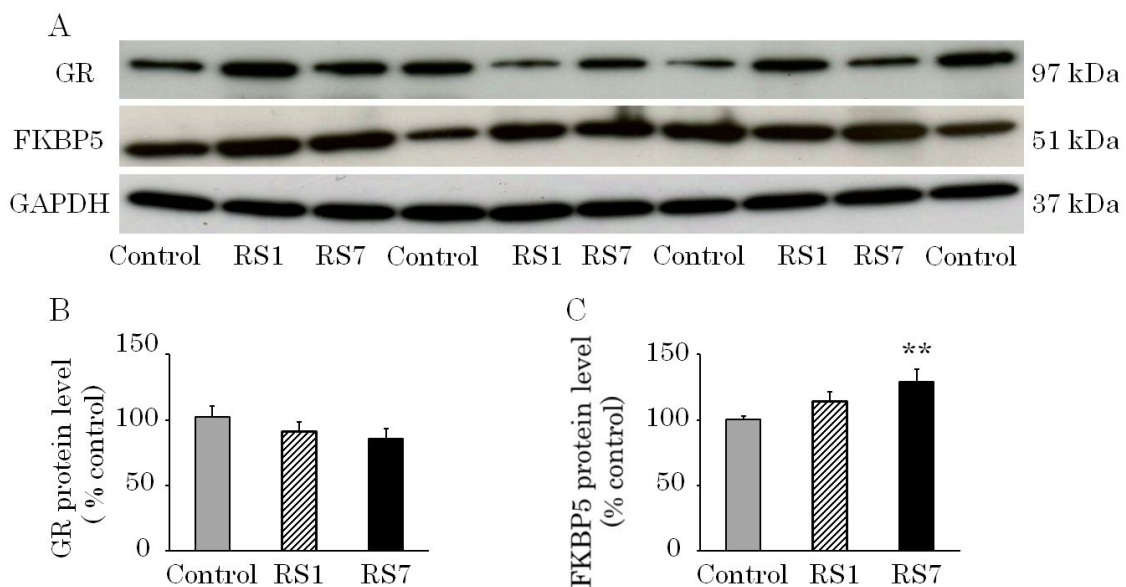


図 3 扁桃体の Western blotting、(A) 代表的な blotting の図、(B) GR および (C) FKBP5 に対する拘束ストレスの効果 (n=12-14)

扁桃体においてコントロール群に対して有意に増加していた ($P < 0.01$)。GR に変化はなかった (図 3)。内側前頭前野および背側海馬においてはこのような変化は認められなかった。RS7 群の扁桃体における FKBP5 増加は、ESC 投与を行った場合には認められなかった (図 4)。

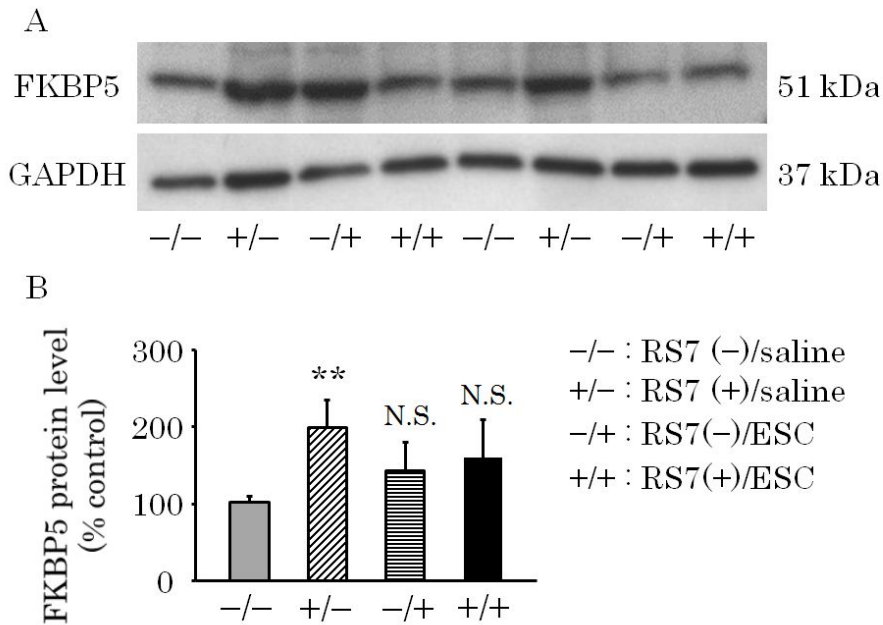


図 4 扁桃体の Western blotting、(A) 代表的な blotting の図、(B) FKBP5 に対する拘束ストレスおよびエスシタロプラムの効果 ($n=8$) N.S., コントロール群と有意差なし。

CRH および CRH 受容体 (CRHR1、CRHR2) の mRNA について、RS7 による脳内の発現変化を測定したが、いずれの部位でも変化はなかった (データ省略)。自殺者死後脳の背外側前頭前野皮質では、非自殺者群に対して、自殺者群で FKBP5 が有意に減少していた ($P=0.045$) (図 5)。

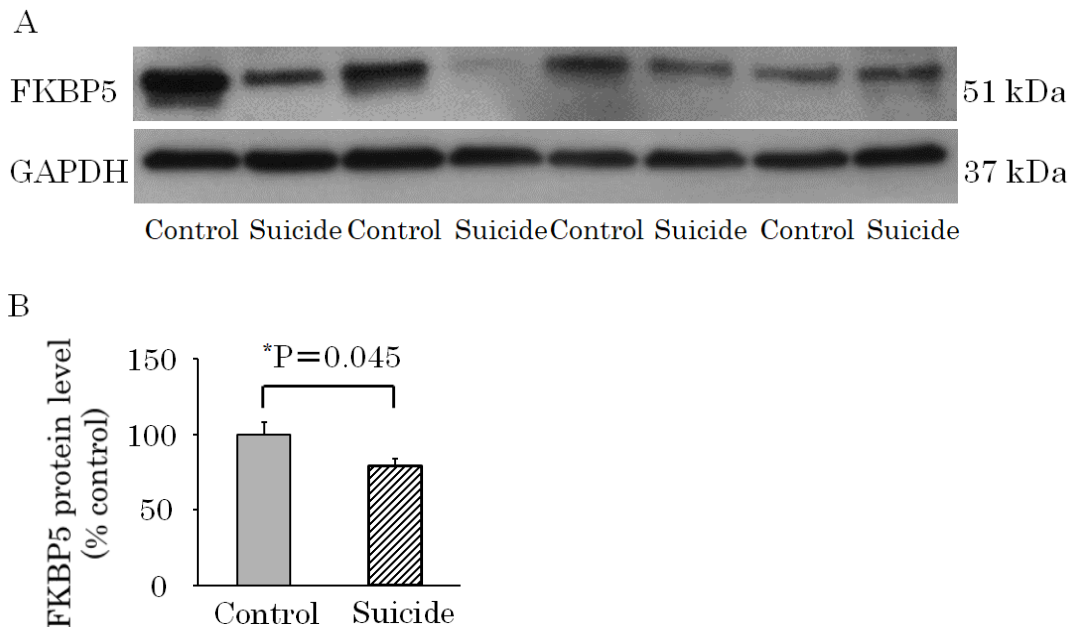


図 5 自殺者死後脳の背外側前頭前野皮質の Western blotting、(A) 代表的な blotting の図、(B) 非自殺者群と自殺者群の FKBP5 量の比較 ($n=8$)

破壊や電気刺激実験より、扁桃体が視床下部室旁核の CRH 産生ニューロンに対してポジティブ・フィードバックをかけていることが知られている。GR は扁桃体の出力核である扁桃体中心

核のニューロンに存在し、また扁桃体中心核から視床下部室旁核へ神経投射が存在する。ストレスによって上昇したルチコステロンは、室旁核へ投射している扁桃体中心核のニューロンをGRを介してさらに活性化されることが推測される。FKBP5はGRの抑制因子であり、また活性化されたGRによって誘導される遺伝子産物である。今回の実験では、反復拘束ストレスによってうつ様行動が増加し、血中コルチコステロン基礎値も上昇し、扁桃体でFKBP5が増加した。このことから、反復拘束ストレスは扁桃体から室旁核への出力ニューロンを持続的に活性化し、これが反復拘束ストレスによるHPA系の機能亢進とうつ様行動増加に寄与していることが推測される。そして、扁桃体から室旁核への出力ニューロンの活性化がGRを介するならば、扁桃体のFKBP5増加は、扁桃体ニューロンの過度の活性化を抑制する適応的变化であることが推測される。多型研究ではFKBP5とうつ病の相関が報告されており、共同研究者の菱本らはFKBP5の機能的多型と自殺が相関することを報告した。FKBP5はPTSDとも相関するが、特にearly life stressによって相関が強まることが判明しており、FKBP5は個体要因(遺伝およびearly life stressに影響されて決まるHPA系の反応性)と環境要因(成人後のストレス)の相互作用を規定する因子ではないかと考えられている。うつ病の病態は、気分・意欲の変化、自律神経症状、リズム障害、HPA系をはじめとする内分泌系の異常と多岐にわたり、動物実験ですべての病態を網羅するのは不可能である。本研究ではHPA系の異常に焦点をあて、扁桃体におけるFKBP5の増加を検出することに成功した。自殺者死後脳の検討では、前頭葉背外側皮質でFKBP5が有意に減少していた。まだ検体数が少ないため(n=8)現在、検体数を増やして測定中である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計9件)

Boku S, Izumi T (co-first author), Abe S, Takahashi, Nishi T, Nomaru H, Naka Y, Kang G, Nagashima M, Hishimoto A, Enomoto S, Duran-Torres G, Tanigaki K, Zhang J, Ye K, Kato S, Männistö PT, Kobayashi K, Hiroi N: Copy number elevation of 22q11.2 genes arrests the developmental maturation of working memory capacity and adult hippocampal neurogenesis. *Molecular Psychiatry* 23(4), 985-992, 2018

DOI: 10.1038/mp.2017.158

Kimura A, Hishimoto A, Otsuka I, Okazaki S, Boku S, Horai T, Izumi T, Takahashi M, Ueno Y, Shirakawa O, Sora I: Loss of chromosome Y in blood, but not in brain, of suicide completers. *PLoS One* 13(1), e0190667, 2018

DOI: 10.1371/journal.pone.0190667

Kumamoto H, Yamaguchi T, Konno K, Izumi T, Yoshida T, Ohmura Y, Watanabe M, Yoshioka M: Repeated fluvoxamine treatment recovers early postnatal stress-induced hypersociability-like behavior in adult rats.

J Pharmacol Sci 136 (1), 1-8, 2018

DOI: 10.1016/j.jphs.2017.12.002

Shikanai H, Oshima N, Kawashima H, Kimura S, Hiraide S, Togashi H, Iizuka K, Ohkura K, Izumi T: N-methyl-d-aspartate receptor dysfunction in the prefrontal cortex of stroke-prone spontaneously hypertensive rat/Ezo as a rat model of attention deficit/hyperactivity disorder.

Neuropsychopharmacology Reports, e12007, 2018

DOI: 10.1002/npr2.12007

Ó Broin P, Beckert MV, Takahashi T, Izumi T, Ye K, Kang G, Pouso P, Topolski M, Pena JL, Hiroi N: Computational analysis of neonatal mouse ultrasonic vocalization. *Curr Protoc Mouse Biol* 8 (2), e46, 2018

DOI: 10.1002/cpmo.46

Otsuka I, Izumi T, Boku S, Kimura A, Zhang Y, Mouri K, Okazaki S, Shiroya K, Takahashi M, Ueno Y, Shirakawa O, Sora I, Hishimoto A: Aberrant telomere length and mitochondrial DNA copy number in suicide completers. *Sci Rep* 7 (1), 3176, 2017

DOI: 10.1038/s41598-017-03599-8

Hiroi N, Takahashi T, Okabe S, Ó Broin P, Nishi A, Ye K, Beckert M, Izumi T, Machida A, Kang G, Abe S, Pena J, Golden A, Kikusui T: Structure and function of neonatal social communication in a genetic mouse model of autism. *Mol Psychiatry* 21, 1208-14, 2016

DOI: 10.1038/mp.2015.190

Tsutsui-Kimura I, Ohmura Y, Izumi T (corresponding author), Matsushima T, Amita H, Yamaguchi T, Yoshida T, Yoshioka: Neuronal codes for the inhibitory control of impulsive actions in the rat infralimbic cortex. *Behav Brain Res* 296, 361-372, 2016

DOI: 10.1016/j.bbr.2015.08.025

An Y, Chen C, Inoue T, Nakagawa S, Kitaichi Y, Wang C, Izumi T, Kusumi I: Mirtazapine exerts an anxiolytic-like effect through activation of the median raphe nucleus-dorsal hippocampal 5-HT pathway in contextual fear conditioning in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 70, 17-23, 2016

DOI: 10.1016/j.bbr.2015.08.025

〔学会発表〕(計2件)

Takeshi Izumi, Robel Ghebream, Ce Wang, Takayuki Yoshida, Hiroki Shikanai, Akiyoto Hishimoto, Mitsuhiro Yoshioka: The role of the brain FKBP5 in depression. 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WCP2018). Kyoto, 2018

王册、泉剛、吉田隆行、大村優、吉岡充弘：幼若期ストレスによる視床下部-下垂体-副腎(HPA)系の機能変化。第90回日本薬理学会，長崎，2017

〔図書〕(計1件)

Izumi T, Kitaichi Y, An Y, Inoue T, Yoshioka M: The amygdala is the target brain site of anxiolytic effects of SSRIs. In Pinna G and Izumi T, editor. *Facilitating resilience after trauma*. Nova Science Publishers, Inc, New York, pp19-89, 2018

6 . 研究組織

(2)研究協力者

研究協力者氏名：小林和人

ローマ字氏名：(KOBAYASHI, kazuto)

研究協力者氏名：中川 伸

ローマ字氏名：(NAKAGAWA, shin)

研究協力者氏名：朴 秀賢

ローマ字氏名：(BOKU, shunken)

研究協力者氏名：菱本明豊

ローマ字氏名：(HISHIMOTO, aki toyo)