

令和元年6月9日現在

機関番号：13802

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19758

研究課題名（和文）うつ病モデルにおける脳糖代謝異常のメカニズム解明

研究課題名（英文）the mechanisms of inconsistency in cerebral blood flow and glucose metabolism in depressive-like behavior model

研究代表者

亀野 陽亮 (Yosuke, Kamenno)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：40537255

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：強制水泳モデルを用い123I-IMPと18F-FDGを投与して脳血流と脳糖代謝の変化を調べた。その結果、強制水泳による高強度急性ストレス負荷が脳糖代謝の低下を伴う脳血流-糖代謝不均衡を誘導することを示した。また、うつ様行動と脳糖代謝異常が報告されているFmr1遺伝子発現制御モデルとメチル化CpG結合蛋白2（Mecp2）発現制御モデルを用い、新奇環境でのうつ様行動の評価を行った。その結果、新奇環境のような低強度慢性ストレス負荷によってこの2つのモデルでうつ様行動が正反対に現れることを突き止めた。すなわち、強度や負荷時間に関わらずストレス反応に脳糖代謝が重要である可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、強度や負荷時間に関わらずストレス反応に対して脳血流よりも脳糖代謝が重要であることを見出した。このことは脳におけるストレス反応の理解を深める成果であり、今後のストレス反応の研究に資するものである。

研究成果の概要（英文）：In this study the forced swim model of rat was evaluated the alteration of cerebral blood flow and glucose metabolism administering the tracer 123I-IMP and 18F-FDG compared with the control group. As a result, the high-intensity acute stress by forced swim induced the inconsistency of cerebral blood flow and glucose metabolism with the decreasing of cerebral glucose metabolism. Fmr1 knockout mice and Mecp2 knockout mice that were reported the abnormality of depressive-like behavior and cerebral glucose metabolism were evaluated the depressive-like behavior in novel environment. As a result, the low-intensity chronic stress by novel environment induced the opposite activity level between the two model. These results suggest that the cerebral glucose metabolism was related to the stress response, which was not affected to the intensity or the duration of the stress.

研究分野：精神医学

キーワード：強制水泳 脳血流 123I-IMP 脳糖代謝 18F-FDG

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

### 1. 研究開始当初の背景

1980年代からPET (positron emission tomography)やSPECT (single photon emission computed tomography)を用いた機能的脳画像検査法が開発され、うつ病でもこれらの手法を用いた研究が多くの研究者によって行われてきた。PETによる研究では、糖代謝は $^{18}\text{F}$ -FDGを、脳血流は $^{15}\text{O}$ ]H $_2\text{O}$ をトレーサーとして用いることにより全脳の分布状況を明らかにできる。

うつ病の糖代謝に関するPET研究の結果は必ずしも一致していないが (Videbech et al, 2000)、多くの報告で、島、大脳辺縁系、基底核で低下している (Su et al, 2014)。一方、うつ病の脳血流に関するPET研究の結果については、報告による不一致が著しいのみならず、脳糖代謝の変化と一致しないことも多い (Dunn et al, 2005)。一般に、健常者や双極性障害では脳糖代謝と脳血流は平行関係(均衡関係)にあるが、うつ病では両者の間の不均衡(uncoupling)がしばしば起きている (Drevets et al, 2000)。そのため、脳血流-糖代謝不均衡の機序を明らかにすることはうつ病の病態生理の解明に寄与する可能性が高く、ひいてはうつ病のバイオマーカーとなる可能性を秘めている。

一方、SSRIなどの抗うつ薬は脳糖代謝や脳血流に影響を及ぼすが、その影響はレスポナーとノンレスポナーで異なるらしい。例えば、SSRIに対するレスポナーでは、背外側前頭前野の脳糖代謝が上昇し (Kennedy et al, 2001)、帯状回の脳血流が増加するという (Joe et al, 2006)。しかし、脳糖代謝への影響についてはほぼ同意が得られているものの、脳血流に関してはそうではない。

以上のように、うつ病では脳糖代謝と脳血流に変化がみられる。うつ病では脳糖代謝と脳血流の間に不均衡が起きていることが多く、脳糖代謝異常のほうが、うつ病の病態や抗うつ薬の影響をより忠実に反映している。動物モデルはうつ病の病因解明や抗うつ薬のスクリーニング検査に有用であるが、うつ様行動の表出と脳糖代謝や脳血流に関する検討は行われていない。

### 2. 研究の目的

うつ病患者では脳局所の血流と糖代謝の間に不均衡が起きていることが知られている。しかし、抗うつ薬の評価系である強制水泳モデルやその他のうつ様行動を示す動物モデルで脳血流-脳糖代謝の不均衡が起きているのか、また起きているとすればどのような不均衡であるのかを明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究では、まず、強制水泳モデルがうつ病と脳糖代謝異常の関連性を研究する上で再現性の高いモデルであることを示す。次いで、その他動物モデルでうつ様行動と脳血流-脳糖代謝の不均衡に関連がみられるかを検証する。

#### 1 全体計画

##### 強制水泳モデルの作成

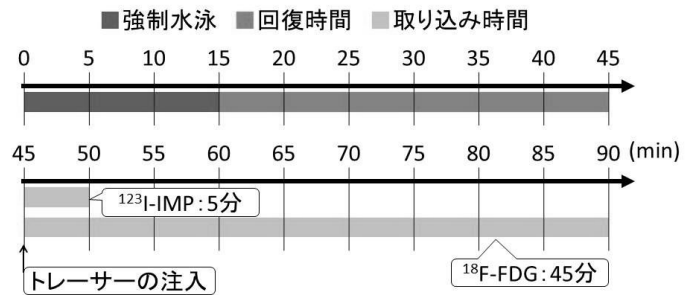
ラット (Sprague-Dawley 系、オス、6週齢) を用いる。7日間、1日1回 12:00~17:00 にハンドリングを行い、体重を測定する。実験当日も測定する。実験前夜より絶食・飲水可とする。

強制水泳には、直径 25 cm、高さ 65 cm の円筒水槽を用い、水槽の底面から 40 cm の高さまで水道水 (25 ± 1 ) を入れておく。ラットを強制水泳群とコントロール群

の 2 群に分け、強制水泳群のラットは水を張った円筒水槽で強制水泳させ、コントロール群は水を入れていない円筒水槽内に置く。強制水泳群の動物については、行動をビデオカメラで記録する。そして、15 分間の観察時間内における登板行動 (climbing)、水泳行動 (swimming)、および、無動 (immobility) の各行動に費やされた時間を測定する。

##### トレーサーの投与と断頭

強制水泳を 15 分間行った後、30 分間の回復時間を設ける。その後、トレーサーを経静脈的に注入し、十分な取り込み時間を設けた後、断頭し、脳を取り出す。トレーサーとして、脳血流解析には  $^{123}\text{I}$ -IMP (0.8 MBq/0.5 ml Syringe) を、脳糖代謝解析には  $^{18}\text{F}$ -FDG (5.0 MBq/0.5 ml Syringe) を用いる。取り込み時間はそれぞれ 5 分、45 分とする。また、断頭断端から血液を採取する。脳はクリオスタット (Thermo Sci) にて 20 $\mu\text{m}$  に薄切し、autoradiography に供する。血液は i-STAT による血糖値、乳酸値の測定に供する。また、血液の放射線量の測定には自動シンチレーションガンマカウンター (Wizard 1480, Perkin-Elmer, Japan) を用いる。



・ 回復時間: 強制水泳で低下した体温を平熱に戻す時間。

## 脳糖代謝異常モデルの行動解析

脳糖代謝異常、およびヒトではうつ病の併発やセロトニン異常が報告されている Fmr1 遺伝子発現制御モデルとメチル化 CpG 結合蛋白 2 (Mecp2) 発現制御モデルを用い、全自動マウス集団飼育型行動試験装置 IntelliCage による行動解析バッテリーでうつ様行動ならびに関連する情動行動の評価を行う。モデルマウスは動物室に搬入後、4週間通常飼育を行う。各マウスに個体識別用 RFID チップを埋め込み、IntelliCage (TSE Systems, Germany) 導入前の 1 週間よりそれぞれ実験群 (各 n=8) と対照群 (各 n=8) を大きな飼育ケージにて同居させて馴化させる。オペラント学習チャンパーが 4 つ設置された IntelliCage チャンパーユニットへ実験群と対照群を同時に投入し、以後 IntelliCage 内で飼育を行いつつ集団内での各個体の行動を記録する。オペラント学習チャンパーへの Visit 数や滞在時間、オペラント行動であるノーズポーク数などを基本指標として、基底活動や行動パターン、概日リズムの評価に加え、情動行動解析 (新奇環境、光刺激、社会的競争課題)、認知的負荷への柔軟性に関わる指標を抽出し、評価する。

## 統計学的解析

$^{123}\text{I}$ -IMP と  $^{18}\text{F}$ -FDG の取り込み率に及ぼす強制水泳の影響については二元配置分散分析を行い、post hoc test として Bonferroni test を行う。トレーサーの取り込み率と血糖値、乳酸値との相関関係については Spearman の順位相関係数を用いて検討する。IntelliCage を用いた実験の解析は、対応のない t 検定および Two-way Repeated Measures ANOVA と Sidak's Multiple Comparison test を用いて検討する。p < 0.05 を統計学的有意とする。全ての統計解析には GraphPad Prism software (version 5.00, GraphPad Software, San Diego, CA) 及び SPSS software (version 19.0 J, IBM, Tokyo) を用いる。

## 2 平成 28 年度計画

平成 28 年度から 29 年度にかけては十分な例数を用い、強制水泳モデルでは脳血流には変化がないが、脳糖代謝が低下していることを明らかにし、強制水泳モデルがうつ病と脳糖代謝異常の関連性を研究する上で再現性の高いモデルあることを示す。

具体的には、脳血流解析群 (n=20) とそのコントロール群 (n=20)、脳糖代謝解析群 (n=20) とそのコントロール群 (n=20) を用い、全体計画に述べた方法で脳血流と脳糖代謝を調べる。

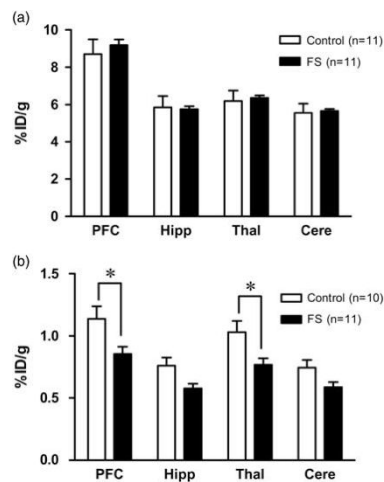
## 3 平成 29・30 年度計画

平成 29 年度は上記解析を引き続き行い、まとめる。また、ヒトの抑うつ状態に類似する低強度慢性ストレス下での検討を行うための実験系を確立し、モデル動物の準備を行う。平成 30 年度には、確立された実験系を用いて、脳糖代謝異常を呈するモデルについて、ヒトの抑うつ状態に類似する低強度慢性ストレス下でのうつ様行動および関連する情動行動を評価する。

## 4. 研究成果

H28 年度には強制水泳モデルを用いて脳血流-糖代謝の不均衡を確認する予備研究を行なった。具体的には強制水泳群 (n=22)、対照群 (n=20) に対して脳血流には  $^{123}\text{I}$ -IMP を脳糖代謝には  $^{18}\text{F}$ -FDG を用いて強制水泳負荷後の各々の取り込み率を比較検討した。

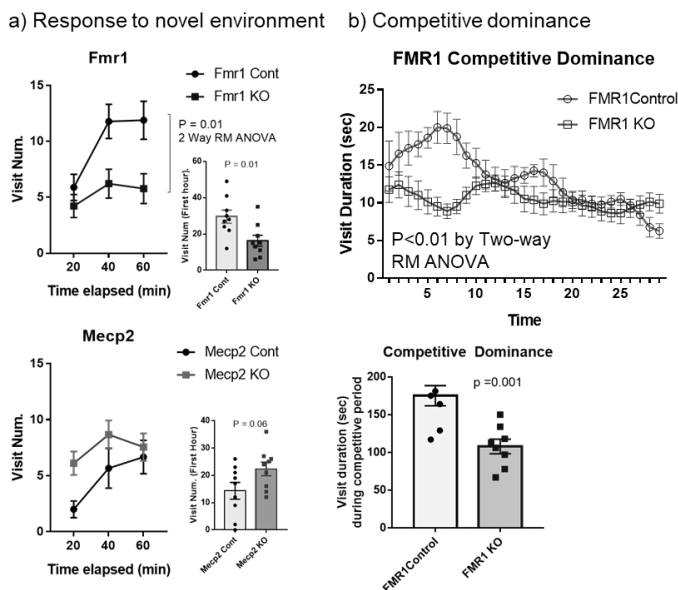
その結果、強制水泳群での  $^{18}\text{F}$ -FDG の取り込み率は前頭前野 ( $0.86 \pm 0.20\% \text{ID/g}$ , p<0.01)、視床 ( $0.77 \pm 0.17\% \text{ID/g}$ , p<0.05) と有意差を認め、海馬 ( $0.58 \pm 0.13\% \text{ID/g}$ )、小脳 ( $0.59 \pm 0.13\% \text{ID/g}$ ) では低下傾向を認めた。また、 $^{123}\text{I}$ -IMP の取り込み率は前頭前野 ( $9.18 \pm 1.00\% \text{ID/g}$ )、視床 ( $6.36 \pm 0.45$ )、海馬 ( $5.76 \pm 0.51\% \text{ID/g}$ )、小脳 ( $5.66 \pm 0.37\% \text{ID/g}$ ) であり、有意差は認めなかった。一方、対照群ではいずれも有意差を認めず、脳血流、糖代謝に変化を認めなかった (右図)。このことから、強制水泳のような高強度の負荷によって脳血流-糖代謝不均衡が生じると共にこの不均衡がストレス反応に関連している可能性を指摘し、Acta Neuropsychiatrica 誌に発表した。



これらの結果の妥当性を検討するため、最終年度には、脳代謝異常、およびうつ病とセロトニン調節に関わることが報告されている病態モデルを用いて、情動行動の評価を行った。強制水泳は低体温と激しい運動負荷を伴う高強度急性ストレスであるため、ヒトの抑うつ状態に類似する低強度慢性ストレス下での検討を進めた。具体的には構成妥当性に優れた動物モデルが確立されている神経疾患のうち、ヒトでうつ様症状や不安様症状の発現がみとめられ、かつ脳糖代謝異常が報告されているものとして、Fmr1 遺伝子発現制御マウスモデルおよびメチル化 CpG 結合蛋白 2 (Mecp2) 発現制御マウスモデルを選定し、全自動マウス集団飼育型行動試験装置 IntelliCage を用い、低強度慢性ストレスである新奇環境を負荷としてうつ様行動ならびに関連する情動行動の

評価を行った(各群 n=8)。その結果、脳糖代謝亢進型の Fmr1 発現制御モデルでは新奇環境ストレス下における探索行動の減少 ( $F(1, 16)=8.031$ ;  $p<0.05$ )、対して、糖代謝抑制型の Mecp2 発現制御モデルでは増加傾向 ( $F(1, 16)=4.092$ ;  $p=0.06$ )をみとめた(右図 a)。同様に、社会的競争ストレス下では、Fmr1 発現制御モデルは対照群に比して劣位の行動 ( $P<0.01$ )を示した(右図 b)が、Mecp2 発現制御モデルでは有意な表現型はみとめられなかった。

以上の結果から、強制水泳のような高強度の急性ストレス下では脳糖代謝の低下が誘導されること、新奇環境や社会的競争課題のような低強度のストレス下では脳糖代謝亢進もしくは抑制モデルで情動行動の表現型が正反対に現れることを突き止めた。すなわち、強度や負荷時間に関わらずストレス反応に脳糖代謝が重要である可能性を見出した。



## 5. 主な発表論文等

{雑誌論文} (計 1 件)

Yosuke Kamen, Katsuaki Suzuki, Shu Takagai, Keiko Iwata, Hideo Matsuzaki, Kenji Takahashi, Tomoyasu Wakuda, Yasuhide Iwata, Yasuhiro Magata, Norio Mori. Mismatch in cerebral blood flow and glucose metabolism after the forced swim stress in rats. *Acta Neuropsychiatrica*. 28(6), 2016, 352-356. 査読あり  
DOI: 10.1017/neu.2016.24

{学会発表} (計 0 件)

{図書} (計 0 件)

{産業財産権}

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

{その他} なし

## 6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。