

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：82611

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19792

研究課題名(和文)脳脊髄液中エタノールアミンを基軸とした、うつ病の新規バイオマーカー・治療法の開発

研究課題名(英文)Development of a novel biomarker and treatment for major depressive disorder focusing on the ethanolamine in the cerebrospinal fluid

研究代表者

小川 眞太郎(OGAWA, Shintaro)

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 疾病研究第三部・流動研究員

研究者番号：00756984

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)：CSFエタノールアミンについて、ヒト研究においてはうつ病のみならず精神疾患に横断的に重要な役割を果たしている可能性や、うつ病の状態依存性マーカーとしての有用性、脳の白質密度および認知機能との関連を明らかにした。動物実験では、LPS反復投与ラットでCSFエタノールアミンが有意に低下し、構成妥当性を有するうつ病モデルであることが示唆された。ラットに4週間エタノールアミン型プラズマローゲン添加飼料を投与したところ、不安様行動の有意な改善およびCSFエタノールアミン濃度の上昇が見られた。本研究において、CSFエタノールアミンのバイオマーカーとしての有用性、新たな治療法開発への応用可能性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：This study revealed that CSF ethanolamine plays important roles among several psychiatric diseases as well as MDD. Also, its usefulness as a state-dependent marker for MDD was shown. The relationships between CSF ethanolamine concentrations and white matter density or cognitive functions were significant. In animal experiments, repeated doses of lipopolysaccharide were administered to rats and showed significantly decreased CSF ethanolamine levels, and this can be considered a suitable model for MDD with construct validity. For establishing a novel treatment for MDD, we administered to rats AIN-93M supplemented with ethanolamine plasmalogen for 4 weeks. Results showed a significant decrease of anxiety-like behaviors and an increase of CSF ethanolamine concentrations in the rats. This study demonstrated that the feasibility of CSF ethanolamine as a biomarker for psychiatric disorders and that CSF ethanolamine may serve to develop novel treatments for psychiatric disorders.

研究分野：精神医学

キーワード：エタノールアミン 脳脊髄液 バイオマーカー 大うつ病性障害 統合失調症 双極性障害 プラズマローゲン アミノ酸

1. 研究開始当初の背景

これまでうつ病の治療は、モノアミン仮説にもとづく創薬および薬物療法に重点が置かれてきた。しかし多国間多施設でのメガスタディの結果、従来の抗うつ薬が奏功しない患者が約三割いることが明らかとなり (Rush et al., *Am. J. Psychiatry*, 2005)、新たなうつ病の治療法が必要とされている。

われわれは最近、基本的な生体構成分子でありアミノ酸関連分子でもある「エタノールアミン」がうつ病患者の脳脊髄液 (cerebrospinal fluid, CSF) 中で著明に減少していることを世界で初めて見出し、報告した (Ogawa et al., *Sci. Rep.*, 2015)。CSF 中のエタノールアミンは向精神薬の服用量とは相関せず、寛解患者群では健常対照者と同レベルまで上昇していた。このことから、CSF 中エタノールアミンはうつ病の状態依存マーカーとして利用しうる可能性が示唆された。また、CSF 中エタノールアミンはドパミン代謝物やセロトニン代謝物との有意な相関も示した。このことから、うつ病の病態機序とも関連する可能性も考えられた。エタノールアミンの生理的役割としては、細胞膜のリン脂質や神経細胞髄鞘などの構成成分であり、内因性カンナビノイドの前駆物質でもある。

しかし、これまでに CSF 中のエタノールアミンがうつ病以外の精神疾患ではどのように変化しているのかを比較した先行報告はわれわれが知る限り存在していない。うつ病のバイオマーカーとしての利用可能性を検討するためには、異なる疾患群も交えて疾患特異性の検討を行なう必要がある。また、うつ病の状態依存マーカーとしての検討を行なうには、患者において治療前後での脳脊髄液中エタノールアミン濃度の変化を検討する必要がある。

さらに、これまで動物のうつ病モデルはヒトのうつ病におけるマーカーが存在しなかったことから、予測妥当性・表面妥当性・構成妥当性のうち前2者の妥当性のみが検討され、構成妥当性の検討は非常に限られていた。このことは、そのモデルが本当にヒトのうつ病を模倣したものであるか、常に疑問を投げかける原因となっており、うつ病研究の発展を妨げる大きな要因ともなっていた。いくつかの動物のうつ病モデルにおいて、ヒトのうつ病患者において見られた CSF 中エタノールアミンの低下が同様に観察されたならば、その動物モデルは構成妥当性を満たした、うつ病研究に適したモデルであると考えられる。

そして、CSF 中のエタノールアミンがうつ病で低下していることから、逆にうつ病の治療のためには CSF 中エタノールアミンが上昇するような介入を施すことで、新しいうつ病の治療方法となり得る可能性があり、これまで従来の抗うつ薬が奏功しなかった患者に

とっての新しい治療の選択肢が生まれる可能性がある。

2. 研究の目的

本課題では、世界最大級のサンプルサイズにおいて CSF 中のエタノールアミン濃度を複数の精神疾患 (うつ病・双極性障害・統合失調症) および対照群間で比較することにより、CSF 中エタノールアミン濃度変化の疾患特異性を明らかにする。同時に、うつ病患者で電気けいれん療法 (electroconvulsive therapy, ECT) 前後での CSF 中エタノールアミン濃度の変化を比較し、うつ病バイオマーカーとしての状態依存性を明らかにする。

また、従来からのうつ病モデル動物において CSF 中エタノールアミン濃度の変化を検討した研究は知られていない。そこで、炎症状態と同時にうつ様行動を引き起こすとされる大腸菌由来のリポ多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 投与モデル (Yirmiya, *Brain Res.*, 1996; O'Connor et al., *Mol. Psychiatry*, 2009)、ストレス誘発性のうつ病モデルとしての慢性拘束ストレスモデル (Chiba et al., *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 2012)、内因性カンナビノイドやドパミンの機能低下が示唆されている Wistar Kyoto 系ラット (Chiba et al., *Psychopharmacology (Berl)*, 2010) の3種類を用い、これら複数のうつ病モデルにおいて CSF 中のエタノールアミン濃度の変化を検討する。低下が見られた場合は「エタノールアミン低下型うつ病」のモデル動物として新規治療法の開発に用いる。

新たな治療法の候補として、エタノールアミンが内因性カンナビノイドの構成成分 (原料) となることから、内因性カンナビノイド代謝酵素阻害が抗うつ作用を有する可能性に着目した (これについては詳細な文献検討を行った: Ogawa and Kunugi, *Curr. Neuropharmacol.*, 2015)。ラットに内因性カンナビノイド代謝酵素の阻害剤を投与し、CSF 中エタノールアミン濃度の上昇やうつ様行動の改善がみられるかを検討する。第二の治療法検討として、食品から摂取することが容易なエタノールアミン型プラズマローゲンを添加した飼料をラットに一定期間摂取させ、CSF 中のエタノールアミンが上昇するか否か、うつ様行動が改善するかを明らかにする。

3. 研究の方法

本研究において、ヒトでの研究についてはヘルシンキ宣言に則り、国立精神・神経医療研究センター倫理委員会の承認を経て実施した。CSF 中エタノールアミン濃度の疾患特異性を検討するため、うつ病患者 (103 名)・双極性障害患者 (67 名)・統合失調症患者

(90名)・健常対照者(130名)での比較を行ない、状態依存性を検討するために電気けいれん療法(ECT)前後のうつ病患者群(14名)において検討を行なった。参加者は、インターネットのホームページや無料地域誌の広告で募集を行なった。すべての参加者からは研究の詳細について説明を行なったのち、書面によるインフォームド・コンセントを得た。参加者には精神疾患簡易構造化面接法日本語版(Mini-International Neuropsychiatric Interview, M.I.N.I.)を用いてスクリーニングを行ない、精神疾患の疑われる参加者については、精神疾患の診断と統計の手引き第四版(Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 4th edition, DSM-IV)を用いて精神科医が確定診断を行ない、そののち心理士による症状評価と臨床情報の記録が行われた。CSFについては、精神科医が側臥位の参加者に表層部の麻酔を行なったのち、第3-4もしくは第4-5腰椎間からスパイナル針を刺入し10 mL採取した。CSF検体は採取後分注し、ただちに-80の超低温槽に保管した。

CSF中のエタノールアミンおよびその他のアミノ酸関連分子の濃度については、陽イオン交換カラムおよびオルトフタルアルデヒドによるポストカラム誘導体化法を用いた高速液体クロマトグラフィー装置LC-2000システム(日本分光,東京)によって測定した。取得したアミノ酸関連分子のデータ解析においては、性別・年齢など交絡因子となる可能性のある変数を共分散分析で統制した上で解析を行なった。さらに、研究協力者らと共同して、認知機能障害(ウエックスラー記憶尺度)や脳画像所見(MRI)とCSF中エタノールアミンの関連についても解析した。MRI撮像における拡散テンソル画像データの取得にはMagnetom Symphony 1.5-tesla装置(シーメンス・ジャパン,東京)を用い、データの解析にはFSLソフトウェアver 4.1(<http://fsl.fmrib.ox.ac.uk/fsl/fsl4.0/tbss/index>)におけるTract Based Spatial Statistics(TBSS)法を用いた。

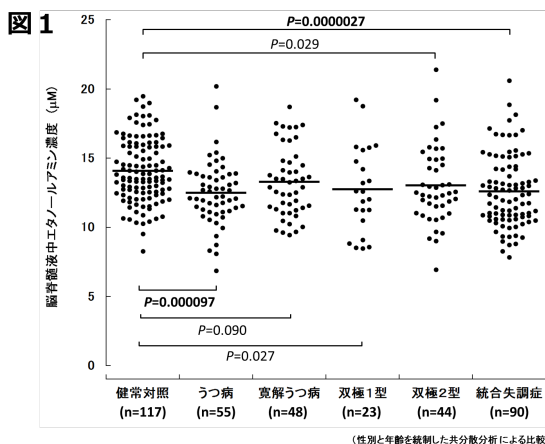
CSFエタノールアミンの変化について複数のうつ病モデル動物で検討するため、以下の動物モデルを用いた。LPS投与モデルにおいては、9週齢のF344系雄性ラットに0.5 mg/kgもしくは1.0 mg/kg用量の大腸菌0111由来LPSを7日間腹腔内に反復投与し、生理食塩水を投与した対照群と比較した(各群n=8)。慢性拘束ストレスモデルにおいては、5週齢のSD系雄性ラットに1日6時間の拘束を3週間行ない、非拘束群との比較を行なった(各群n=6)。Wistar Kyoto系ラットでの検討においては、10週齢のWistar Kyoto系雄性ラットについて、対照群であるWistarラットとの比較を行なった(各群n=6)。これらの各動物モデルにおいて、うつ様行動およびCSF中のエタノールアミン濃度の変化を比較し、検討する。

続いて、ラットを用いてうつ病症状を改善させるための研究を行なった。第一に、内因性カンナビノイド代謝酵素である脂肪酸アミド水解酵素(fatty acid amide hydrolase, FAAH)の阻害剤であるURB597(0.3 mg/kg)、またはFAAHの活性化剤であるPDP-EA(1.0 mg/kg)を動物に7日間腹腔内投与し、情動関連行動の変容が見られるか否か、およびCSF中エタノールアミン濃度が変化するか否かを検討した(各群n=4)。

第二に、食品中に豊富に存在するグリセロリン脂質の一種であるプラズマローゲンに着目し、標準飼料であるAIN-93Mにエタノールアミン型プラズマローゲンを添加した特殊飼料を作成し、6週齢のF344系雄性ラットに4週間投与した。対照群には通常のAIN-93M飼料を投与した。それぞれの群において、4週目に7日間、LPS 1.0 mg/kgもしくは生理食塩水を腹腔内投与する群を設定し、計4群を作成した(各群n=5)。4週間後、各群を用いてテストバッテリーによる行動試験を行なった。具体的には、うつ様行動を測定するための強制水泳試験、不安様行動を測定するためのオープンフィールド試験・高架式十字迷路試験、感覚情報処理障害を測定するためのプレパルス抑制試験を行なった。行動試験ののち動物からはCSFおよび各脳部位を採取し、組織中リン脂質の構成を解析した。リン脂質の解析には、受託解析サービスを利用した。また、高速液体クロマトグラフィー装置を用いてCSF中エタノールアミン濃度の測定も行なった。

4. 研究成果

CSF中エタノールアミンの有用性を検討するため、濃度の低下について疾患特異性の検討を行なった。その結果、うつ病患者群において健常対照者群と比較して有意にエタノールアミン濃度が低下していたものの($P = 0.000097$, analysis of covariance [ANCOVA])、うつ病患者のみならず統合失調症患者の一部においてもCSF中エタノールア



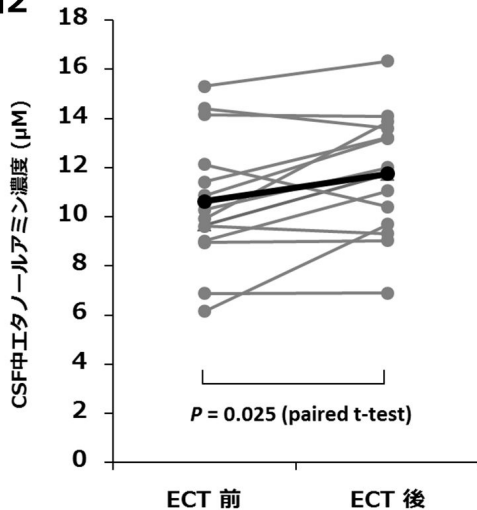
(性別と年齢を統制した共分散分析による比較)

ミン濃度が低下していることが明らかとなり($P = 0.000027$, ANCOVA)、CSF中エタノールアミンが疾患横断的に精神疾患の機序

に重要な役割を果たしている可能性が明らかとなった (図1)。

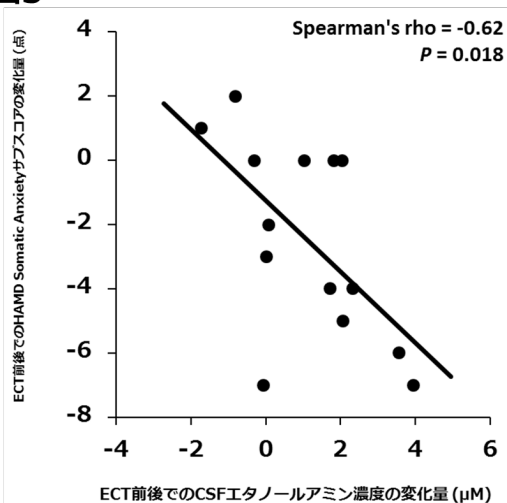
また、CSF 中エタノールアミンの状態依存マーカーとしての可能性の検討においては、うつ病患者 14 名で ECT 受療前後での CSF 中エタノールアミン濃度を比較した。その結果、ECT 受療後は受療前に比べて有意に CSF 中エタノールアミン濃度が上昇しており ($P = 0.025$, paired t -test; 図2)、さらにエタノール

図2



ールアミンの増減とハミルトンうつ病症状評価尺度のサブ項目スコアの変化量とは有意な負の相関を示した ($P = 0.018$, Spearman's rank correlation test; 図3)。

図3



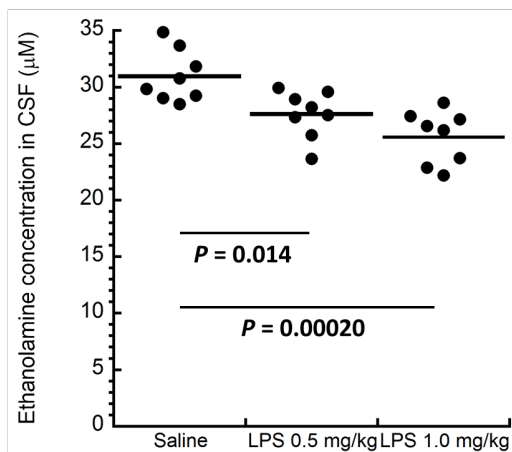
さらに、サブサンプルにおいて認知機能との関連を検討するため、ウェックスラー記憶検査のスコアと CSF 中エタノールアミン濃度を性別と年齢を統制した偏相関解析において比較した。健常対照者および統合失調症・うつ病・双極性障害患者全体で解析したところ ($n = 223$)、「言語性記憶」($r = 0.22$, $P = 0.0010$, partial correlation test)、「一般的記憶」($r = 0.22$, $P = 0.0011$)、「遅延再生」($r = 0.21$, $P = 0.0014$) の各スコアと

の有意な相関が明らかとなり、CSF 中エタノールアミンと認知機能との関連が示された。

参加者の一部における脳画像所見との関連の検討では、拡散テンソル画像解析において、脳の白質密度と関連する fractional anisotropy (FA) 値と CSF エタノールアミン濃度との有意な相関が見られた。うつ病患者 ($n = 27$) のみならず健常対照者 ($n = 32$) や統合失調症患者群 ($n = 29$) でも相関が見られたものの (全て $P < 0.05$ (familywise error rate 調整後))、うつ病患者での相関の程度が最も強かった。このことから、疾患横断的に CSF 中のエタノールアミン濃度が白質の構造と関連する可能性が示唆された。

動物での検討においては、「エタノールアミン低下型うつ病モデル」を明らかにするため、複数のうつ病動物モデルにおいて CSF 中エタノールアミンの低下を検討した。LPS を 7 日間腹腔内に投与したモデルにおいては、強制水泳試験でうつ様行動の指標とされる不動時間が、1.0 mg/kg 用量での LPS 投与群において生理食塩水投与群に比べて有意に延長した ($P = 0.0072$, ANOVA + Dunnett's test)。さらに、CSF 中エタノールアミン濃度も、LPS の 0.5 mg/kg 投与群では生理食塩水投与群に比べて有意な差は見られなかったものの、1.0 mg/kg 投与群においては有意に低下する結果が明らかとなった ($P = 0.00020$, ANOVA + Dunnett's test, 図4)。

図4 CSF中エタノールアミン濃度



一方、Wistar Kyoto ラットにおいては、強制水泳試験では有意に不動時間の延長が見られたものの ($P < 0.001$)、Wistar Kyoto ラットの CSF 中エタノールアミンの値は対照群である Wistar ラットと比較してむしろ有意に上昇していた ($P = 0.000007$, t -test)。慢性拘束ストレスモデルにおいては、強制水泳試験において当初からうつ様行動が認められず、CSF 中のエタノールアミンも対照群と比べて有意な変化を示さなかった。このことから、LPS 反復投与モデルは構成妥当性の点でヒトのうつ病モデルと一致する結果となり、うつ病研究において有用なモデルとな

りうることが示された。

続いて、CSF 中エタノールアミンに着目したうつ病の新規治療法の樹立についての第一の検討として、内因性カンナビノイド経路の関与を調べた。ラットの腹腔内に7日間生理食塩水もしくはFAAH阻害剤のURB597 (0.3 mg/kg)、またはFAAH活性化剤のPDP-EA (1.0 mg/kg) を投与し、その後行動解析や試料中のアミノ酸解析などを行なった。その結果、生理食塩水投与群に比べ、URB597 や PDP-EA の投与群においては、強制水泳時間の不動時間に有意な差は見られなかった。さらに、CSF 中のエタノールアミンの濃度についても有意な群間差は認めなかった。以上から、今回の実験で用いた薬剤用量と投与形態においては、内因性カンナビノイド経路とCSF エタノールアミンとの関連は明らかとはならなかった。

さらに、うつ病の新規治療法の樹立についての第二の検討として、エタノールアミン型プラズマローゲン添加特殊飼料をラットに4週間投与し検討を行なった。その結果、エタノールアミン型プラズマローゲン添加飼料を摂取した群では、通常のAIN-93Mを摂取した群に比べて高架式十字迷路試験におけるオープンアーム滞在時間が有意に延長し ($P = 0.048$, t -test)、不安様行動が減少している結果が明らかとなった。また、血漿中のエタノールアミン型プラズマローゲン濃度が有意に上昇し ($P = 0.021$, t -test)、CSF 中エタノールアミン濃度も有意に上昇していた ($P = 0.012$, t -test)。さらに、LPS 投与群では、血漿中プラズマローゲン濃度が有意に低下していた ($P = 0.015$, t -test)。このことから、エタノールアミン型プラズマローゲンの経口摂取がCSF 中エタノールアミン濃度を上昇させ、情動行動を改善する可能性が示唆された。強制水泳試験におけるうつ様行動の有意な変容は観察されなかったものの、少なくとも、うつ病患者における不安症状を改善させる可能性が示唆され、新しいうつ病の治療の樹立につながりうる重要な成果が得られた。

本研究の結果、CSF 中エタノールアミンが低下している精神疾患横断的な類型が存在すること、また、うつ病においてCSF 中エタノールアミン濃度の状態依存性が明らかとなった。さらに、脳の白質構造や認知機能との関連も明らかとなった。動物においては、LPS 反復投与モデルが構成妥当性を伴ううつ病の動物モデルであることが明らかとなった。また、エタノールアミン型プラズマローゲンの摂取がCSF 中エタノールアミンを上昇させる新規治療法となる可能性が明らかとなった。今後の精神医学研究のさらなる発展のためには、より多くのデータを重ねつつ知見をより深め、研究を継続していくことが必要である。

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 件)

[学会発表](計 1 件)

Shintaro Ogawa, Kotaro Hattori, Miho Ota, Hiroshi Kunugi. Reduced cerebrospinal fluid ethanolamine concentration in major depressive disorder. 30th CINP World Congress of Neuropsychopharmacology, Seoul, Korea, July 3rd, 2016.

[図書](計 件)

[産業財産権]

出願状況(計 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 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

小川 眞太郎 (OGAWA, Shintaro)
国立研究開発法人 国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 疾病研究第三部・流動研究員
研究者番号：00756984

(2)研究分担者

()
研究者番号：

(3)連携研究者

()
研究者番号：

(4)研究協力者

功刀 浩 (KUNUGI, Hiroshi)

服部 功太郎 (HATTORI, Kotaro)
太田 深秀 (OTA, Miho)
松尾 淳子 (MATSUO, Junko)
千葉 秀一 (CHIBA, Shuichi)