

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：85402

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19796

研究課題名(和文) 難治性うつ病の分子基盤としてアストロサイト由来GDNFに着目した研究

研究課題名(英文) Study focusing on astrocyte-derived GDNF as a molecular basis of treatment-resistant depression.

研究代表者

梶谷 直人(Kajitani, Naoto)

独立行政法人国立病院機構(呉医療センター臨床研究部)・その他部局等・研究員(移行)

研究者番号：60755742

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)：脳アストロサイトにおけるグリア細胞株由来神経栄養因子(GDNF)の産生能が障害されることがうつ病の重症化しいては難治化の分子基盤の一つを担っていると仮説を立て、その仮説を検証した。培養細胞を用いた検討から、アストロサイトを介したGDNF産生に重要な受容体としてリゾフォスファチジン酸受容体(LPA1)を同定した。動物実験を用いた検討から、抗うつ薬を長期投与した際にみられる抗うつ効果が、LPA1受容体阻害剤併用または、LPA1ヘテロKOマウスで抑制されることを明らかにした。また、線条体と海馬におけるGDNF発現変化が抗うつ行動に重要である可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：In this study, I examined the hypothesis that glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in brain astrocytes plays a role as one of the molecular basis of refractory of major depressive disorder. In vitro study, I identified lysophosphatidic acid receptor 1 (LPA1) as an important receptor for the antidepressant-induced GDNF production in astrocytes. In vivo study, I revealed that chronic antidepressant treatment-induced behavioral effect was blocked by co-administration with LPA1 inhibitor and its effect was not observed in LPA1 hetero KO mice. I also found that expression of GDNF in the striatum and hippocampus might be important for the behavioral effect of antidepressant.

研究分野：精神神経科学

キーワード：GDNF 抗うつ薬 うつ病

1. 研究開始当初の背景

うつ病は単一の原因からなる疾患ではなく、複数の病因からなる多因子性の疾患群と考えられる。従って、同じ“うつ病”の患者でも治療効果に差があり、うつ病患者の20-30%は抗うつ薬に抵抗性を示す難治性うつ病である。

うつ病のモノアミン仮説は三環系抗うつ薬(TCA)が登場した1950年代から提唱されている仮説であり、SSRIなどの新規抗うつ薬はこの仮説を根拠に開発が進んできた。ゆえに、既存の抗うつ薬はモノアミン神経伝達を高めることが治療効果に重要であるとされ、逆に、治療抵抗性うつ病では、モノアミン神経系には依存しない病因が存在する可能性が考えられる。従って、モノアミンに依存しない病因の特定・解明は、難治性うつ病の新たな治療戦略へとつながり、非常に重要な研究課題である。

これまでに我々は、脳内に豊富に存在する細胞の一つであるアストロサイトに抗うつ薬を処置することで、グリア細胞由来神経栄養因子(GDNF)、線維芽細胞増殖因子(FGF2)、血管内皮増殖因子(VEGF)などの抗うつ効果への関与が示唆されている複数の神経栄養因子の産生が増加することを明らかにした(Kajitani et al. 2012)。興味深いことに、この作用はモノアミンとは独立した作用であり、また、同様の処置を神経細胞に行っても神経栄養因子の産生誘導はみられなかったことから、アストロサイトに特異的な薬理作用である可能性を示した。

歴史的に偶然抗うつ作用が発見された経緯から考えると、モノアミンに特化した新規抗うつ薬に比べて、初期のTCAにはモノアミン以外にも元来有している薬理作用が存在する可能性がある。根拠として我々の研究結果より、SSRIよりもTCAの方がアストロサイトにおけるGDNF産生作用が強いことを明らかにしている(Hisaoka, Takebayashi et al. 2007)。他にも、入院が必要な重症例のうつ病患者にはSSRIよりもTCAの方が治療上有効とする報告が複数あることや、一般的な治療ガイドラインで示されているように、双極性障害においてSSRIよりもTCAの方が躁転のリスクが高いことを考えると、TCAにはモノアミン以外の抗うつ作用に関連する薬理作用が残存している可能性が考えられる。

一方で、うつ病の病因の一つにアストロサイトの機能障害が考えられる。具体的には、死後脳研究より、家族性うつ病において前頭前皮質のアストロサイトの数・密度の低下およびアストロサイトの活性化のマーカーであるGFAPの低下が報告されている(Rajkowska et al. 2013)。

2. 研究の目的

上述した研究背景を踏まえ、本研究課題ではうつ病のモノアミンに依存しない病変としてアストロサイトにおけるGDNF低下があ

ると推定し、GDNF産生能が障害されることがうつ病の重症化しいては難治化につながるという仮説を立て、その仮説を検証するために、薬理的・遺伝子工学的手法により検証すること、さらには、得られた成果の有用性をうつ病患者サンプルを用いて検証することを目的とする。

3. 研究の方法

【検討1】培養細胞を使用したGDNF産生に重要な受容体の探索

ラット初代培養アストロサイトを作製した。また、アストロサイトのモデル細胞であるC6細胞も使用した。LPA1阻害剤およびsiRNAを使用し、抗うつ薬誘導性GDNF発現変化に与える影響について検討した。GDNF mRNAおよびproteinの測定には、real time PCR法およびELISA法を使用した。

【検討2】マウスを使用した行動実験

マウスにおける抗うつ薬長期投与による抗うつ行動を検討するために強制水泳試験を行った。強制水泳試験とは、逃避不可の水槽にマウスを入れ無動時間を測定する試験であり、抗うつ薬投与により無動時間が減少することから、抗うつ行動の評価に最も良く使用されている方法である。抗うつ薬にはin vitro実験の結果から、GDNF産生作用の強いTCAを使用した。

抗うつ行動におけるLPA1の関与を検討するために、LPA1ヘテロKOマウスをJackson Laboratoryから購入し、繁殖を行い実験に使用した。

行動試験終了後のマウスを犠死後、うつ病に関連する複数の脳部位(前頭皮質・線条体・側坐核・海馬・扁桃核・視床下部・腹側被蓋野)を回収し、RNAを抽出した。Real time PCR法により、GDNF mRNA発現変化を検討した。

【検討3】ヒト臨床サンプルを用いた検討

うつ病患者サンプルの収集に関しては、研究協力者の協力のもと、抗うつ薬等の薬物治療抵抗性であり電気けいれん療法適応患者の末梢血及び脳脊髄液の収集を行った。GDNF protein levelの測定に関してELISA法を用いて検討した。

なお、ヒト由来臨床サンプルを用いた研究計画は、国立病院機構呉医療センター倫理委員会において承認済みである。被験者からは研究参加に関して十分な説明を行ったうえで文書による同意を得ている。

4. 研究成果

【検討1】

・C6細胞およびラット初代培養アストロサイトにおいて、TCAをはじめとした複数の抗うつ薬によるGDNF発現増加作用はLPA1阻害剤(AM966, Ki16425)によって有意に抑制された。
・C6細胞において、LPA1 siRNA処置によ

て LPA1 発現を抑制した条件では抗うつ薬による GDNF 発現増加作用は減弱したが、LPA2 または LPA3 siRNA では抗うつ薬による GDNF 増加作用に影響はなかった。

・アストロサイトにおける抗うつ薬誘導性 GDNF 産生シグナルメカニズムを詳細に検討したところ、「抗うつ薬 LPA1 FGFR ERK GDNF 産生増加」という一連のシグナルが活性化されることを明らかにした。

これらの結果から、モノアミンに依存しないアストロサイトにおける抗うつ薬の新たな作用点として LPA1 が重要であることを明らかにした(Kajitani et al. J Biol Chem. 2016)。

【検討 2】

・動物を用いて抗うつ薬抵抗性モデルとして評価するために、強制水泳試験・novelty suppressed feeding 試験・open field 試験等の行動実験系を立ち上げ、抗うつ薬急性投与または長期投与で抗うつ薬による行動変化が起きる実験系であることを確認した。

・強制水泳試験において、抗うつ薬を長期投与した際にみられる無動時間の減少が、LPA1 受容体阻害剤を併用することで抑制されることを明らかにした。

・購入した LPA1 ヘテロ KO マウスを繁殖し、さらにホモ KO マウスの繁殖を試みたが、生後の生存率が約 25% 以下と非常に悪く実験に使用するための一定数が確保できなかったため、実験にはヘテロ KO マウスのみを使用した。

・LPA1 ヘテロ KO マウスに抗うつ薬を長期投与し、強制水泳試験を行ったところ、抗うつ薬による無動時間減少作用が見られなかった。

・強制水泳試験後に正常マウスと比較して、抗うつ薬長期投与並びに LPA1 阻害剤を併用したマウスの複数の脳部位から RNA を抽出し、GDNF mRNA の発現変化を調べたところ、線条体と海馬において GDNF 発現変化と強制水泳試験における抗うつ行動が相関することを明らかにした(図)。

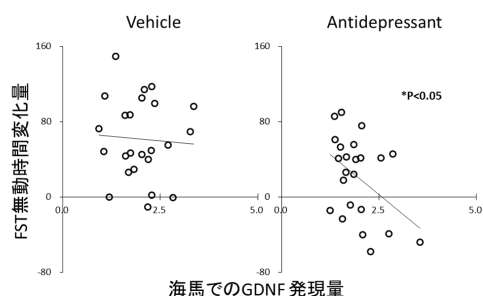


図: 抗うつ薬投与群において、行動変化とGDNF発現量が相関する

上述の結果から、LPA1 シグナル不全により抗うつ薬抵抗性を示したことから、アストロサイトにおける GDNF 産生作用に重要な LPA1 シグナルが難治性うつ病の分子基盤の一つである可能性を示すことが出来た。

【検討 3】

・研究協力者の協力のもと、抗うつ薬等の薬物治療抵抗性であり電気けいれん療法適応患者の末梢血及び脳脊髄液に関して、概ね目標数収集することができた。

・研究協力者のもと収集したうつ病患者脳脊髄液を使用して、GDNF protein level の測定を ELISA 法で試みたが、測定感度以下のため検出できなかった。

培養細胞・動物実験等の基礎研究で得た知見に関して、臨床サンプルを用いて検討を行う計画であったが、脳脊髄液で GDNF protein を測定することは困難であることが分かった。今後は、LPA1 シグナルの下流にある他の因子に着目して検討を行う必要があることが分かった。

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 6 件、全て査読有)

1. Hisaoka-Nakashima K, Kajitani N, Kaneko M, Shigetou T, Kasai M, Matsumoto C, Yokoe T, Azuma H, Takebayashi M, Morioka N, Nakata Y.

Amitriptyline induces brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA expression through ERK-dependent modulation of multiple BDNF mRNA variants in primary cultured rat cortical astrocytes and microglia.

Brain Res. 2016 Mar 1;1634:57-67. doi: 10.1016/j.brainres.2015.12.057.

2. Shibasaki C, Takebayashi M, Itagaki K, Abe H, Kajitani N, Okada-Tsuchioka M, Yamawaki S.

Altered Serum Levels of Matrix Metalloproteinase-2, -9 in Response to Electroconvulsive Therapy for Mood Disorders.

Int J Neuropsychopharmacol. 2016 Aug 31;19(9). doi: 10.1093/ijnp/pyw019.

3. Abe H, Hisaoka-Nakashima K, Kajitani N, Okada-Tsuchioka M, Yano R, Itagaki K, Shibasaki C, Morioka N, Nakata Y, Takebayashi M.

The expression of glial cell line-derived neurotrophic factor mRNA by antidepressants involves matrix metalloproteinase-9 activation in rat astroglial cells.

Biochem Biophys Res Commun. 2016 Oct 28;479(4):907-912. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.09.070.

4. Itagaki K, Takebayashi M, Shibasaki C, Kajitani N, Abe H, Okada-Tsuchioka M,

Yamawaki S.
Factors associated with relapse after a response to electroconvulsive therapy in unipolar versus bipolar depression. J Affect Disord. 2017 Jan 15;208:113-119. doi: 10.1016/j.jad.2016.08.047.

5. **Kajitani N**, Miyano K, Okada-Tsuchioka M, Abe H, Itagaki K, Hisaoka-Nakashima K, Morioka N, Uezono Y, Takebayashi M. Identification of Lysophosphatidic Acid Receptor 1 in Astroglial Cells as a Target for Glial Cell Line-derived Neurotrophic Factor Expression Induced by Antidepressants. J Biol Chem. 2016 Dec 30;291(53):27364-27370. doi: 10.1074/jbc.M116.753871.

6. Shibasaki C, Itagaki K, Abe H, **Kajitani N**, Okada-Tsuchioka M, Takebayashi M. Possible Association between Serum Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) Levels and Relapse in Depressed Patients following Electroconvulsive Therapy (ECT). Int J Neuropsychopharmacol. 2018 Mar 1;21(3):236-241. doi: 10.1093/ijnp/pyx086.

[学会発表](計 14 件)

1. Hiromi Abe, Kazue Hisaoka-Nakashima, **Naoto Kajitani**, Mami Okada-Tsuchioka, Kei Itagaki, Chiyo Shibasaki, Norimitsu Morioka, Yoshihiro Nakata, Minoru Takebayashi
Antidepressant amitriptyline activates matrix metalloproteinase in astroglial cells: involvement in glial cell line-derived neurotrophic factor expression
30th CINP World congress of neuropsychopharmacology, 2016/7/3-5, Seoul

2. Kei Itagaki, Chiyo Shibasaki, Kenichi Oga, Wataru Omori, **Naoto Kajitani**, Hiromi Abe, Mami Okada-Tsuchioka, Minoru Takebayashi
Serum levels of autotaxin in major depressive disorders and schizophrenia: a pilot study
Society for Neuroscience 2016, 2017/11/12-17, San Diego

3. 竹林実、岡田麻美、柴崎千代、板垣圭、**梶谷直人**、安部裕美、宮野加奈子、中島一恵、森岡徳光、上園保仁
グリアから謎解く精神疾患のトランスレショナル研究～気分障害とアストロサイトの観点から～

第 38 回日本生物学的精神医学会・第 59 回日本神経化学学会大会 合同年会、平成 28 年 9 月 8 - 10 日

4. **梶谷直人**、宮野加奈子、岡田麻美、安部裕美、板垣圭、上園保仁、竹林実
アストロサイトにおいて GDNF 産生作用を導く新たな「抗うつ薬受容体」の同定
第 35 回躁うつ病の薬理・生化学的研究懇話会、平成 28 年 11 月 4 5 日、山口

5. **梶谷直人**
アストロサイトを標的とした抗うつ薬の作用点としての LPA1 受容体の役割
第 4 回サイコグリア研究会、平成 29 年 5 月 20 日、佐賀

6. **梶谷直人**、宮野加奈子、岡田麻美、安部裕美、板垣圭、中島一恵、森岡徳光、上園保仁、竹林実
アストロサイトにおける GDNF 産生に關与する抗うつ薬受容体 LPA1 の同定
次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2017、平成 29 年 8 月 29 日、京都

7. 安部裕美、**梶谷直人**、岡田麻美、板垣圭、大盛航、二五田基文、竹林実
抗うつ薬はアストロサイトにおいて Src チロシンキナーゼ/MMP-9 カスケードを介してグリア細胞株由来神経栄養因子産生を誘導する
第 39 回日本生物学的精神医学会・第 47 回日本神経精神薬理学会 合同年会、平成 29 年 9 月 28 - 30 日、札幌

8. 大盛航、服部功太郎、岡田麻美、**梶谷直人**、安部裕美、板垣圭、吉田寿美子、功刀浩、竹林実
精神疾患における脳脊髄液(CSF)中の Matrix metalloproteinase (MMP)に関する検討
第 36 回躁うつ病の薬理・生化学的研究懇話会、平成 29 年 10 月 27 - 28 日、東京

9. 岡田麻美、**梶谷直人**、宮野加奈子、安部裕美、大盛航、板垣圭、上園保仁、竹林実
アストロサイトを標的とした新たな抗うつ薬の作用点としての LPA1 の可能性
第 36 回躁うつ病の薬理・生化学的研究懇話会、平成 29 年 10 月 27 - 28 日、東京

10. **Naoto Kajitani**, Kanako Miyano, Mami Okada-Tsuchioka, Hiromi Abe, Wataru Omori, Kei Itagaki, Yasuhito Uezono, Minoru Takebayashi
Identification of lysophosphatidic acid receptor 1 in astrocytes as a target for glial cell line-derived neurotrophic factor expression induced by antidepressants
Society for Neuroscience 2017,

2017/11/11-15, Washington DC

11. Kei Itagaki, Hiromi Abe, Chiyo Shibasaki, Wataru Omori, **Naoto Kajitani**, Mami Okada-Tsuchioka, Kotaro Hattori, Sumiko Yoshida, Hiroshi Kunugi, Minoru Takebayashi

Reduced serum and cerebrospinal fluid levels of autotaxin in major depressive disorder

Society for Neuroscience 2017, 2017/11/11-15, Washington DC

12. **梶谷直人**, 岡田麻美、安部裕美、大盛航、板垣圭、竹林実

脳内における抗うつ薬受容体 (LPA1) 発現細胞の特定とその役割

第5回サイコグリア研究会、平成30年5月26日、神戸

13. 岡田麻美、宮野加奈子、**梶谷直人**、安部裕美、大盛航、板垣圭、上園保仁、竹林実
グリアにおける抗うつ薬受容体としてのLPA1の可能性-抗うつ薬のLPA1への直接作用に関する検討-

第5回サイコグリア研究会、平成30年5月26日、神戸

14. 大盛航、服部功太郎、岡田麻美、**梶谷直人**、安部裕美、板垣圭、功刀浩、竹林実

精神疾患における脳脊髄液中 matrix metalloproteinases の検討

第5回サイコグリア研究会、平成30年5月26日、神戸

〔図書〕

なし

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

ホームページ等

国立病院機構呉医療センター・中国がんセンター 臨床研究部

www.kure-nh.go.jp/department/clinical_research/

国立病院機構呉医療センター・中国がんセンター 精神科

www.kure-nh.go.jp/department/psychiatry/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梶谷 直人 (KAJITANI NAOTO)

独立行政法人国立病院機構(呉医療センター臨床研究部), その他部局等, 研究員

研究者番号: 60755742