

令和元年6月18日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20888

研究課題名(和文)ベンゾジアゼピン系抗不安薬の長期投与による認知機能低下メカニズムの解明

研究課題名(英文)The effect of chronic benzodiazepine administration on cognitive function

研究代表者

古川 智範 (Furukawa, Tomonori)

弘前大学・医学研究科・助教

研究者番号：60402369

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、慢性的なベンゾジアゼピン系薬剤の使用によって認知機能が低下するメカニズムを探るため、ジアゼパム(DZP)長期投与とマウスを用いて研究を行った。行動評価解析結果から、想起能力の低下がDZP長期投与した老齢マウスにおいて認められた。また、DZPを長期投与した老齢マウスでは、想起能力の低下や、CA1およびCA3領域におけるスパインの密度の減少が認められた。一方、海馬CA1領域におけるLTPやアポトーシス、細胞新生に対するDZP長期投与の影響は認められなかった。老齢マウスでは、DZP長期投与によりCA3領域のスパインが減少することで想起能力が低下する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果から、ベンゾジアゼピン系薬剤であるジアゼパム(DZP)の長期使用は老齢マウスの海馬神経細胞のスパインを減少させ、認知機能を低下させる可能性が示唆された。一方、若齢マウスではDZP長期投与による海馬LTPやスパイン密度への影響は認められたものの、認知機能行動には有為な低下は認められなかった。これらの結果は、DZP長期投与の認知機能への影響は加齢に伴って変遷することを示すものであり、学術的にも興味深い。今後、本研究結果をもとにDZP長期投与による認知機能低下の予防法や治療法の開発へ発展させることで、社会的に貢献することができると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, to investigate the effect of chronic benzodiazepine (BZD) on cognitive dysfunction, memory behavior, spine density of hippocampal neuron, and LTP of hippocampus were examined in chronic diazepam (DZP, aBZD) treated young and mice. The behavior test indicated that chronic DZP treatment impaired retrieval of aged mice. In DZP-treated groups, the spine density of hippocampal pyramidal neurons was reduced in CA1 and CA3 of aged mice and CA1 of young mice. The CA1 LTP was reduced by chronic DZP treatment in young mice but not in aged mice. These results suggested that chronic DZP treatment might decrease spine density of CA3 neuron in hippocampus, and thus impaired retrieval performance in aged mice.

研究分野：神経生理学

キーワード：benzodiazepine diazepam Lcn2

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

1. 研究開始当初の背景

ガンマアミノ酪酸 (GABA) は脳内神経回路において抑制的に作用する神経伝達物質であり、認知、学習、情動などの高次脳機能に大きく関与している。GABA による抑制性情報伝達に障害が生じると、てんかん・不安症・うつ病・統合失調症・自閉症などの精神疾患が発症すると考えられている。これらの精神疾患治療薬として使用されるベンゾジアゼピン (BZD) は鎮静、睡眠誘導、抗不安、抗けいれんなどの効果を示す一方、BZD 長期投与により認知症発症のリスクが増加するという臨床報告が急増している。申請者は、BZD に長期暴露したマウス脳の大脳皮質、海馬、扁桃体の全領域において、lipocalin2 (Lcn2) の有為な発現増加が認められることを見出した。しかしながら、中枢神経系の長期的な BZD 暴露により発現が増加する Lcn2 がどのような神経機能障害を起こし認知機能を低下させるのかは未解明である。

2. 研究の目的

Lcn2 は鉄結合タンパク質や炎症性タンパク質として知られ、中枢神経系における神経変性症の病態形成やミクログリア細胞の活性化、シナプス機能障害、細胞増殖との関与が報告されている。本研究では神経回路機能障害に関わるシナプス構造のスパイン、ミクログリア活性化状態や細胞増殖を解析し、BZD 長期暴露が中枢神経系に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

マウスは 8 ~ 10 週齢 (若齢) および 54 週齢 (老齢) のマウスを用いた。BZD の長期投与は、BZD 系薬剤であるジアゼパム (DZP) を注入した浸透圧ポンプをマウス腹腔内に留置することにより行った。投与開始から 14 日後、行動評価および組織学的・生理学的解析を行った。行動評価はモリス水迷路を用いて空間記憶能力を評価し、さらに 10 日後に想起能力を評価した。興奮性シナプス構造であるスパインは、4% パラフォルムアルデヒドで固定したマウス脳組織切片を作成後、海馬神経細胞にルシファーイエローを注入して可視化し、レーザー共焦点顕微鏡により観察を行った。神経回路機能の評価として海馬 LTP の測定を行った。ミクログリア細胞の活性化は、マウス由来のミクログリア細胞株 (BV-2) を用いて解析を行った。細胞死は TUNEL 染色法を用いて行い、細胞増殖は EdU を腹腔内に投与したマウスを用いて免疫組織学的に評価した。

4. 研究成果

8 ~ 10 週齢の DZP 慢性投与マウスの認知機能をモリス水迷路試験により評価した。空間学習直後 (Short-term) および 14 日後 (Long-term) において想起能力を解析した結果、有為な認知機能の低下は認められなかった (Fig.1 左)。BZD 系薬剤の慢性使用による認知機能の低下は高齢者において顕著であることから、老齢マウスを用いて同様の行動を行ったところ、BZD 慢性投与による有為な認知機能の低下が認められた (Fig.1 右)。

海馬 CA1 領域および CA3 領域において、興奮性シナプス構造のスパインを解析した結果、若齢マウスでは CA3 領域において、老齢マウスでは CA1、CA3 両領域において DZP 長期投与によるスパイン密度の減少が認められた (Fig.2)。

DZP 長期投与の生理的機能への影響を評価するため、海馬 CA1 領域における LTP を記録した。その結果、DZP 長期投与による LTP への影響は若齢マウスでは認められたが、老齢マウスでは認められなかった (Fig.3)。また、DZP 非投与群における海馬 LTP は若齢マウスと比べ老齢マウスの方が弱いことがわかった。

免疫組織学的解析法により、DZP 長期投与老齢マウス海馬領域におけるアポトーシスおよび細胞新生を解析した結果、TUNEL 陽性細胞の増加は認められず、

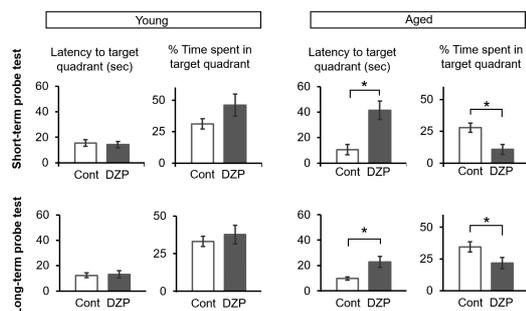


Fig. 1 モリス水迷路による行動評価

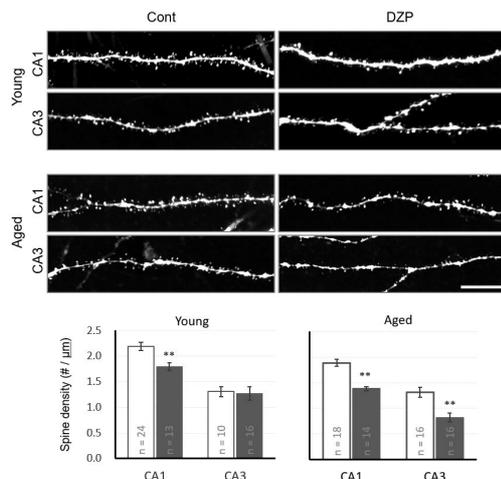


Fig. 2 海馬 CA1、CA3 領域における神経細胞のスパイン密度

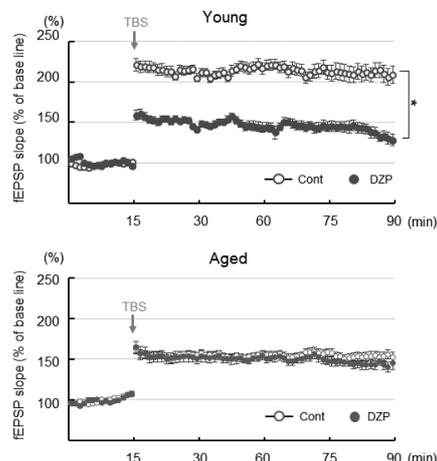


Fig. 3 DZP 長期投与の海馬 CA1 長期増強への影響

新生細胞数は DZP 非投与群においてもほとんど認められなかった。また、BV-2 細胞の培養液に DZP を 3 日間投与して形態を観察したが、DZP による影響は認められなかった。

本研究により、DZP の長期投与は老齢マウスにおいて海馬 CA3 領域のスパイン密度を減弱させ、認知機能（想起する能力）を低下させることが示唆された。DZP 非投与群の老齢マウスでは、若齢 DZP 非投与群よりもスパイン密度や LTP が減少・減弱していたことから、加齢に伴う神経回路の機能的・組織的変遷が、DZP 長期投与による影響に違いを生じさせた可能性が考えられる。今後、DZP の長期投与により生じた組織的・機能的変化に対して、Lcn2 や GABA_A 受容体などの分子がどのように関係するかについて、分子レベルで検討していく必要がある。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. Ogata Y., Nemoto W., Yamagata R., Nakagawasai O., Shimoyama S., Furukawa T., Ueno S., Tan-No K. Anti-hypersensitive effect of angiotensin (1-7) on streptozotocin-induced diabetic neuropathic pain in mice. *Eur J Pain* 23, 739-749, 2019. (査読有)
2. Koga K, Shimoyama S., Yamada A., Furukawa T., Nikaido Y., Furue H., Nakamura K., Ueno S. Chronic inflammatory pain induced GABAergic synaptic plasticity in the adult mouse anterior cingulate cortex. *Mol Pain* 14, 1744806918783478, 2018. (査読有)
3. Furukawa T., Shimoyama S., Miki Y., Nikaido Y., Koga K., Nakamura K., Wakabayashi K., Ueno S. Chronic diazepam administration increases the expression of Lcn2 in the CNS. *Pharmacol Res Perspect* 5, e00283, 2017. (査読有)
4. Nikaido, Y., Furukawa T., Shimoyama S., Yamada J., Migita K., Koga K., Kushikata T., Hirota K., Kanematsu T., Hirata M., Ueno S. Propofol Anesthesia Is Reduced in Phospholipase C-Related Inactive Protein Type-1 Knockout Mice. *J Pharmacol Exp Ther* 361, 367-374, 2017. (査読有)

〔学会発表〕(計 7 件)

1. Furukawa T., Shimoyama S., Ogata Y., Ueno S. 「The effect of benzodiazepine on proliferation and survivals of CNS cells」 [Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies](2019 年 03 月 28 日 - 2019 年 03 月 31 日)
2. 古川智範、二階堂義和、下山修司、小瀧佳輝、中村和彦、上野伸哉 「The effect of chronic diazepam administration on hippocampal long-term potentiation and spine morphology」 [日本生理学会](2018 年 03 月 28 日 - 2018 年 03 月 30 日)
3. 古川智範、下山修司、三木康夫、二階堂義和、古賀浩平、中村和彦、若林孝一、上野伸哉 「慢性的ジアゼパム投与による Lcn2 発現およびスパイン形態への影響」 [日本神経科学学会](2017 年 07 月 20 日 - 2017 年 07 月 23 日)
4. 二階堂義和、古川智範、下山修司、古賀浩平、中村和彦、上野伸哉 「ジアゼパム長期投与は老齢マウスの空間記憶学習を阻害する」 [日本生理学会] (2017 年 03 月 28 日 - 2017 年 03 月 30 日)
5. 古川智範、下山修司、三木康夫、二階堂義和、古賀浩平、中村和彦、若林孝一、上野伸哉 「慢性的なジアゼパム投与による Lcn2 発現増加」 [日本生理学会] (2017 年 03 月 28 日 - 2017 年 03 月 30 日)
6. 古川智範、下山修司、三木康夫、二階堂義和、古賀浩平、中村和彦、若林孝一、上野伸哉 「ジアゼパム長期投与マウスにおける脳内 Lcn2 発現および認知機能の解析」 [第 154 回弘前医学会例会](2017 年 01 月 27 日)
7. 古川智範、下山修司、三木康夫、二階堂義和、古賀浩平、中村和彦、若林孝一、上野伸哉 「ジアゼパム長期投与マウス脳組織のトランスクリプトーム解析」 [弘前医学会総会] (2016 年 06 月 18 日 - 2016 年 06 月 19 日)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号(8桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：上野 伸哉
ローマ字氏名：(UENO, shinya)
研究協力者氏名：下山 修司
ローマ字氏名：(SHIMOYAMA, shuji)
研究協力者氏名：二階堂 義和
ローマ字氏名：(NIKAIDO, yoshikazu)

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。