

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2020

課題番号：17K10274

研究課題名（和文）グルタミン酸トランスポーターを標的とした新規抗ストレス薬・抗うつ薬の創薬研究

研究課題名（英文）Drug discovery research for novel anti-stress and antidepressant drugs targeting glutamate transporters

研究代表者

高橋 弘 (Takahashi, Kou)

高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部門・准教授

研究者番号：20415582

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、グルタミン酸トランスポーターを標的とした新規抗ストレス薬・抗うつ薬の創薬研究であり、ストレス負荷によるEAAT2発現の変化及びグルタミン酸シグナル伝達系の変化を詳細に検討することを目的としている。

急性ストレスを負荷したマウスでは、扁桃体のEAAT2発現の上昇が認められた。一方、慢性ストレス負荷したマウスでは、EAAT2発現の減少傾向が認められた。さらに、慢性ストレス負荷は、グルタミン酸受容体のリン酸化を低下させた。これらの研究は、うつ症状の発症に関わる脳内機序の一端を明らかにし、新しい抗うつ薬の開発につながることを期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

うつ病は、ストレスで発症するが、その発症には個人差が生じるなど、詳細な発症機序は不明である。また、既存の抗うつ薬は、モノアミン(セロトニンなど)を標的とした薬が用いられているが、臨床効果発現に数週間を要し、決して満足できるものではない。

グルタミン酸は、中枢神経系で主要な興奮性神経伝達物質であり、グルタミン酸トランスポーターにより、その伝達が厳密に調節されている。本研究は、慢性ストレス負荷をしたマウスにおいて、グルタミン酸トランスポーターの発現量の減少やグルタミン酸シグナル系の変化を明らかにした。これらは、うつ症状の発症に関与すると考えられ、新しい抗うつ薬の開発につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：This study is a drug discovery research of novel anti-stress and antidepressant drugs targeting glutamate transporters. The aims of this study are to investigate the changes of EAAT2 expression and glutamate signal transduction system after stress. The expression of EAAT2 was increased in amygdala after acute stress. On the other hand, the decline trend of EAAT2 expression was observed after chronic stress. In addition, the phosphorylation of glutamate receptor was decreased after chronic stress.

These studies are expected to clarify a part of the brain mechanism involved in the development of depressive symptoms and lead to the development of new antidepressants.

研究分野：精神薬理学

キーワード：グルタミン酸トランスポーター ストレス うつ症状 EAAT2 グルタミン酸受容体

## 1. 研究開始当初の背景

うつ病は、DALY (障害調整生命年: 障害のため失われた健康的な生活年数) で3位に位置し、2030年には1位になると予想されており、社会経済の損失が大きい疾患である。また、うつ病は、ストレスで発症するが、その発症には個人差が生じるなど、詳細な発症機序は明らかとなっていない。現在のうつ病治療は、約60年前に偶然発見されたモノアミン(セロトニンなど)を標的とした薬が用いられている。これら既存の抗うつ薬は、臨床効果発現に数週間を要し、決して満足できるものではない。

近年、グルタミン酸受容体阻害薬 ketamine が、数時間という即効性で抗うつ薬抵抗性のうつ病患者の症状を改善する発見があり、うつ病治療のパラダイムシフトが起こった。このグルタミン酸は、中枢神経系で主要な興奮性神経伝達物質であり、前シナプス終末から放出され、シナプス間隙を拡散し、受容体に結合する。このシナプス伝達は、グルタミン酸トランスポーター(EAATs: Excitatory amino acid transporters)によるグルタミン酸の細胞内への取り込みにより終了する。現在まで5種類のEAATs(EAAT1-5)が同定されており、脳内でEAAT2がもっとも多く発現している。EAAT2は、グリア細胞の一つであるアストロサイトに発現し、シナプス間隙から9割のグルタミン酸取り込みに寄与している。つまり、EAAT2発現の減少は、グルタミン酸シグナルを過剰にし、興奮毒性により神経細胞傷害を起こし、様々な疾患に影響を及ぼす可能性がある。実際、EAAT2の発現減少は、多くの精神・神経疾患で認められている<sup>1</sup>。

## 2. 研究の目的

本研究では、グルタミン酸トランスポーターを標的とした新規抗ストレス薬・抗うつ薬の創薬研究を行うため、以下の3項目に関して明らかにすることを目的とする。1) ストレス負荷後、うつ症状の主症状である興味の消失の発現とストレス反応性の関係を明らかにする。また、2) 恐怖・不安に関わる脳部位である扁桃体について、ストレス負荷後のEAAT2発現を明らかにする。さらに、3) ストレス負荷後のうつ様行動とグルタミン酸受容体 NR2B のリン酸化の関係を明らかにする。

## 3. 研究の方法

1) うつ病の発症機序を明らかにするため、同程度の慢性ストレス負荷したマウスのうつ様行動の発症群と非発症群を比較検討した(ストレス脆弱性の検討)。

慢性ストレスマウスモデルは、表面妥当性、構成概念妥当性、薬効予測妥当性に優れた、慢性社会的敗北うつ病モデルマウスを用いた。攻撃性の高いマウス(ICR)と通常のマウス(C57BL)を一つのケージに、一定時間(5-10分間)入れると、喧嘩してC57BLマウスは敗北する(直接刺激)。次に、喧嘩しないように、穴の空いた透明な仕切り板で、別のICRマウスとC57BLマウスを分けて飼育し、攻撃は出来ないが音や匂いなどの感覚刺激を与える(間接刺激)。この2つの刺激を10日間繰り返すことでC57BLマウスは、うつ症状を呈するようになる。慢性ストレス負荷後にショ糖嗜好性試験で興味の消失を示すマウスと示さないマウスを比較検討した。

2) ストレス後の扁桃体EAAT2発現を検討するため、急性ストレスモデルマウスおよび慢性ストレスモデルマウスを作成し、EAAT2蛋白質の発現を解析した(ストレス負荷によるEAAT2発現の検討)。

急性ストレスマウスモデルは、マウスに 1 時間の拘束ストレスを負荷した。慢性ストレスマウスモデルは、社会的敗北うつ病モデルマウスを用いた。EAAT2 の蛋白質の発現は、Western blot 法により解析した。

3) ストレスによるグルタミン酸シグナルの変化を検討するため、社会的敗北うつ病モデルマウスでの NR2B のリン酸化を Western blot 法により解析した(うつ症状とグルタミン酸シグナル系の検討)。

慢性ストレス負荷後、うつ症状を評価するための行動解析を行った。行動解析は、シヨ糖嗜好性試験(興味の消失)、高架式十字迷路(不安)、新奇環境摂食抑制試験(興味と不安)、コートスコア(遂行能力)、巣づくり試験(遂行能力)、社会的相互作用テスト(社会性)、Y 字迷路試験(認知記憶)を行った。NR2B のリン酸化とうつ症状の行動との相関解析を行った。

#### 4 . 研究成果

##### 1)ストレス脆弱性の検討:

慢性ストレスを負荷したマウスについて、シヨ糖嗜好性試験によりうつ症状の主症状である興味の消失を測定した。同程度のストレス負荷を行ったが、約 4 割のマウスはストレス抵抗性を示し、6 割のマウスは脆弱性を示した (図 1)。ストレス抵抗性群および脆弱性群の両群共に副腎の重量増加が認められた (図 2)。ストレスは、内分泌系・自律神経系・免疫系などが関わっている。副腎は、内分泌系の視床下部-下垂体-副腎皮質系と自律神経系の交感神経-副腎髄質系に関与する。副腎重量の増加が認められ、ストレス抵抗性・脆弱性の両群共に同様にストレス反応が起こっていたことが示唆された。

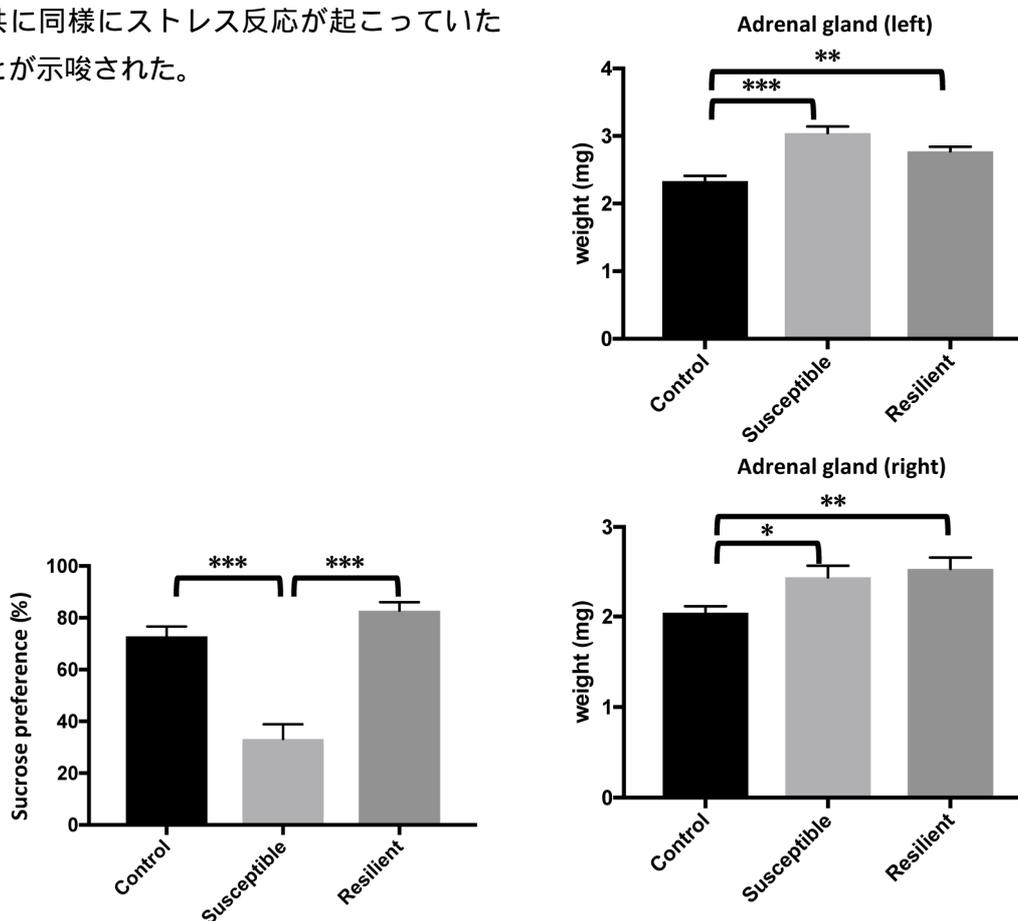


図1 慢性ストレス後の脆弱性群と抵抗性群シヨ糖嗜好性試験により、興味の消失の反応性を分類した。

図2 慢性ストレス後の脆弱性群と抵抗性群での副腎重量慢性ストレス後の左右の副腎重量を測定した。脆弱性群・抵抗性群ともに有意に増加が認められた。

## 2) ストレス負荷による EAAT2 発現の検討:

急性ストレスを負荷したマウスは、ストレス負荷をしていないマウスと比較して、扁桃体の EAAT2 発現の上昇が認められた(図 3)。慢性社会性敗北ストレスが EAAT2 蛋白質の発現に影響するかを Western blot 法により検討した。慢性ストレス負荷したマウスでは、EAAT2 発現の減少傾向が認められた。これらは、急性ストレスがグルタミン酸シグナルを抑制し、慢性ストレスがグルタミン酸シグナルを促進すると考えられた。

うつ病やうつ病モデル動物において、EAAT2 が重要な役割を担う可能性を示唆する報告がある。

EAAT2 の発現がうつ病患者及び慢性ストレス動物で減少する<sup>2,3</sup>。さらに、EAAT2 機能の抑制が動物のうつ症状(興味低下、不安上昇、絶望行動)を惹起

する<sup>4,5</sup>。この EAAT2 発現減少は主に内側前頭前皮質で観察されており、今回は扁桃体の EAAT2 発現低下を認めた。以前、申請者らは、脳内の神経細胞の活動を c-fos 蛋白質の発現を指標に解析した。その結果、ストレス負荷で扁桃体の c-fos 陽性細胞数が増加していた。従って、EAAT2 発現低下が神経細胞の活動に影響を与えた可能性がある。また、扁桃体に EAAT2 阻害剤を投与することで、社会性の低下が報告されている<sup>6</sup>。今回認められた慢性ストレスによる EAAT2 減少が、ストレスによる社会性低下に寄与すると考えられた。

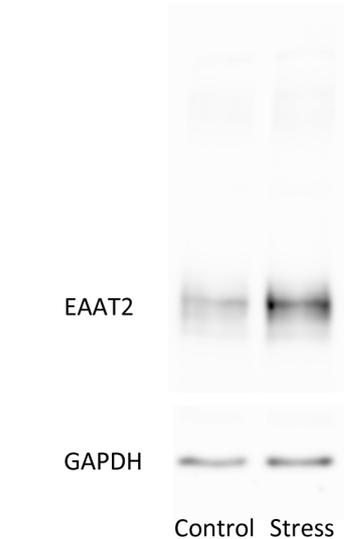


図3 急性ストレス後のEAAT2発現  
拘束ストレス負荷後に扁桃体のEAAT2  
発現量の上昇が認められた。

## 3) うつ症状とグルタミン酸シグナル系の検討:

慢性社会的敗北うつ病モデルマウスを作成し、興味の消失、不安、遂行能力低下などのうつ症状とグルタミン酸受容体のリン酸化を定量した。慢性ストレス負荷は、グルタミン酸受容体のリン酸化を低下させた。この NR2B リン酸化率は、興味および遂行能力の行動に対して正相関傾向が認められた。うつ症状を示すほどリン酸化 NR2B の割合が低下した。

本研究により、うつ症状の発症に関わる脳内機序の一端を明らかにした。今後、より広領域で高空間分解能の解析を行うことで、うつ病発症の脳内分子機序が解明され、新しい抗うつ薬の開発につながることを期待される。

1. Takahashi K, Foster JB, Lin CL. Glutamate transporter EAAT2: regulation, function, and potential as a therapeutic target for neurological and psychiatric disease. *Cell Mol Life Sci.* 2015, 72(18):3489-506.
2. Rajkowska G, Stockmeier CA. Astrocyte pathology in major depressive disorder: insights from human postmortem brain tissue. *Curr Drug Targets.* 2013, 14(11):1225-36.
3. Sanacora G, Banasr M. From pathophysiology to novel antidepressant drugs: glial contributions to the pathology and treatment of mood disorders. *Biol Psychiatry.* 2013, 73(12):1172-9.
4. Banasr M, Chowdhury GM, Terwilliger R, Newton SS, Duman RS, Behar KL, Sanacora G.

Glial pathology in an animal model of depression: reversal of stress-induced cellular, metabolic and behavioral deficits by the glutamate-modulating drug riluzole. *Mol Psychiatry*. 2010, 15(5):501-11.

5. John CS, Smith KL, Van't Veer A, Gompf HS, Carlezon WA Jr, Cohen BM, Öngür D, Bechtholt-Gompf AJ. Blockade of astrocytic glutamate uptake in the prefrontal cortex induces anhedonia. *Neuropsychopharmacology*. 2012, 37(11):2467-75.

6. Lee Y, Gaskins D, Anand A, Shekhar A. Glia mechanisms in mood regulation: a novel model of mood disorders. *Psychopharmacology (Berl)*. 2007, 191(1):55-65.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                      | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                          | 備考 |
|-------|--|--|----|
| 研究分担者 | 由利 和也<br><br>(Yuri Kazunari)<br><br>(10220534) | 高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部門・教授<br><br><br><br>(16401) |    |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|         |         |