

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10278

研究課題名(和文) 回復しないうつ病への新治療戦略：末梢-中枢双方向からの神経新生促進と神経回路調整

研究課題名(英文) Study on new therapeutic interventions for refractory depression.

研究代表者

橋本 恵理 (HASHIMOTO, Eri)

札幌医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30301401

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：難治化を呈するうつ病に対する有用な治療戦略の確立を目指し、これまでの成果を基に作製した難治性うつ病モデル動物を用いて検討を行った。本モデルでは血清や側坐核でのBDNFレベルの変動に関して通常のうつ病モデルと異なる動きがみられ、行動面の改善には側坐核におけるBDNFの低下が重要と考えられた。側坐核は報酬刺激の処理・報酬予測に関係する部位で、社会的相互作用の障害への影響の面からも、報酬系への関与が治療的アプローチの上で重要な役割を果たすことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

臨床現場においては、標準的な抗うつ薬治療では回復しないうつ病の存在が問題となっており、このような遷延化・難治化するうつ病に対する有用な治療戦略を確立していくことが何よりも求められている。難治性うつ病モデルを用いた本研究により、側坐核でのBDNF変動等の治療的関与が示唆され、報酬系への影響を含め、難治性うつ病の病態理解および新たな治療的アプローチ確立の上での学術的意義および社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：We produced depression model rats by exposure of chronic corticosterone treatment and refractory depression model rats by alcohol exposure during the fetal period followed by the corticosterone treatment during adolescent period. The treatment with SSRIs reversed depression-like behavior and normalized BDNF levels in serum and the hippocampus in depression model rats. In contrast, serum BDNF levels were higher in refractory depression model rats than in control rats, and the treatment with escitalopram, but not sertraline reversed depression-like behavior in refractory depression model accompanied by the reduction of BDNF levels in nucleus accumbens. The treatment with blonanserin reversed abnormal social interactions and altered BDNF levels in serum in refractory depression model rats. These results suggest that serum and nucleus accumbens BDNF level reductions have potential in therapeutic interventions for treatment-resistant refractory depression.

研究分野：生物学的精神医学

キーワード：神経科学 脳・神経 精神疾患 うつ病 難治性うつ病モデル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

臨床現場では、遷延化・難治化するうつ病の存在が、自殺者の増加と共に深刻な社会問題となっている。標準的な抗うつ薬治療では回復しないうつ病とは何か、何故回復しないのか、これはうつ病の本質にも迫る重大な疑問であるが、既存の抗うつ薬治療が奏功しない以上、抗うつ薬の作用機序を追い求めているだけでは答が得られないことは明白で、従来とは異なる切り口での病態理解および治療戦略が必要となる。

脳機能画像研究の進歩により、うつ病患者の脳解析から海馬の萎縮が報告され、神経幹細胞からの神経新生の異常とそれに伴う神経可塑性変化がうつ病の病態に關与すること、脳内で生じた神経回路変異が社会的な認知機能障害に影響していること等が示唆されている。また、新生神経細胞が既存の神経回路に組み込まれてシナプス形成を行うことが示され、神経回路網の修正によって脳機能の回復がもたらされる可能性が近年注目されている。よって、うつ病の難治例や再発例への対処を考える上では、ダイナミックな脳神経回路網の再構築を関与することが重要であると考えられる。そこで、これまでの一連の研究において、外来からの神経幹細胞移植による神経細胞への分化の試み等を介して神経分化調整因子の探索を進め、アルコールが転写抑制因子 NRSF/REST 活性化を介した神経新生抑制作用を有し、抗うつ薬による神経新生促進を阻害すること^{1, 2)}、抗うつ薬刺激による血小板からの脳由来神経栄養因子 (brain derived neurotrophic factor: BDNF) 遊離もアルコール曝露により阻害されること等を見出した。また、アルコールがうつ病の治癒阻害因子として働くことに着目し、臨床研究においても、抗うつ薬治療中の飲酒量が多いと抑うつ症状の改善度が低いことを確認した³⁾。これらの成果をふまえ、胎児期アルコール曝露と若年期のコルチコステロン投与の二重のストレスを組み合わせることで、新たに難治性うつ病モデルを作製した。さらに、抗うつ薬単独投与では改善しない行動異常に対し、抗うつ薬と神経幹細胞投与を組み合わせた再生医療的アプローチが奏功することを見出し、このような治療の効果に関して、神経新生促進因子が末梢 - 中枢双方向で果たす役割の解析を進めることが、新たな治療法および生物学的マーカーの開発に有用であると考えられた。

2. 研究の目的

アルコールがうつ病の治癒阻害因子として働くことに着目して独自に作製した難治性うつ病モデル動物を用いて、新たな治療的アプローチの効果に関する分子機構の解明に臨む。特に、BDNF 等の神経新生促進因子が、末梢 - 中枢双方向で果たす役割の解析を進め、今後の治療応用に展開するための基盤となる知見を得ることを目指す。

(1) 難治性うつ病モデルを用いて、抗うつ薬・抗精神病薬等の各種向精神薬投与の効果解析を行い、行動異常の変化についてうつ病モデルと比較検討する。

(2) 神経新生に關与することが知られている BDNF は、一般にうつ病では血中や海馬の BDNF レベルが低く、抗うつ薬治療後に増加するとの報告が主だが、抗うつ薬非反応群では同様の変動を示さない。難治性うつ病モデルにおける血中および脳内各領域における BDNF レベルの解析を行い、病態の差異の検討および薬物治療反応性予測を含めた生物学的マーカーとしての有用性を評価する。あわせて、脳内各領域サンプルを用いて、アミノ酸含量の定量を行い、比較検討する。

(3) 抗うつ薬の末梢での作用に関する新たな検索として、既存の抗うつ薬が示すようなセロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害活性を有するが血中から脳内への移行性がほとんどない新規化合物を用いて、即ち、いわば脳へ行かない抗うつ薬候補物質による治療的効果を行動薬理学的に検討する。

3. 研究の方法

(1) モデル動物の作製と薬剤投与：難治性うつ病モデルの作製には、妊娠ラットに対して、胎生期 E10 から E13 にかけて妊娠ラット対して 1 日総量 6g/kg アルコールを 12 時間毎 2 回に分け、ゾンデを用いて経口強制投与した。出生仔は生後 4 週齢で離乳させ、生後 70 日から 90 日の 3 週間コルチコステロン 20mg/kg 皮下注射を施行した。対照群は、母体に生理食塩水を経口投与して 1% tween 皮下注射を行った。通常のうつ病モデルラット群は、母体に生理食塩水を経口投与してコルチコステロン 20mg/kg 皮下注射を行って作製した。向精神薬の投与は、生後 70 日から 90 日にかけて、セルトラリン 10mg/kg、エスシタロプラム 4mg/kg、プロナンセリン 1mg/kg をそれぞれ腹腔内投与した。

(2) 行動薬理学的解析

強制水泳試験：各薬剤の最終投与日に 15 分間の予備試験を行い、翌日に 5 分の本試験を実施し、ビデオ録画により無動時間を測定した。強制水泳試験は円柱状の水槽を用いて行い、水位は 30cm とし、水温は 25 ± 1 に保持した。

Social interaction test: 一辺 90cm 四方のオープンフィールド (グレーウォール) を用意し、照度計 (三和電子機械) を用いて各所 100 ルクスに統一した。試験前日に試験ラットをオー

ブンフィールドに入れて 30 分間の馴化を行った。試験当日は異なるケージで飼育されたラット（パートナーラット）を用意し、試験ラットと共にオープンフィールドに入れた。10 分間における能動的な社会的行動（sniffing, following, climbing over or under the partner）が観察された回数と時間をビデオ録画後に計測、評価した。

(3) 血清および脳組織における BDNF 測定：向精神薬投与後の行動薬理的検索の後に、ラットを麻酔下で採血後、断頭を行った。血液は 30 分間の静置後に血清を分離した。脳は前部帯状回、海馬、側坐核の各組織をパンチングにて採取後、RIPA Lysis Buffer (Santa Cruz) に溶解、回収してサンプルを作成した。BDNF の測定は、Quantikine ELISA (R&D Systems) を用いて、血清サンプルと共に測定した。

(4) 抗うつ薬の末梢での作用に関する新たな検索として、既存の抗うつ薬が示すセロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害活性を有するが血中から脳内への移行性がほとんどない新規化合物を用いて、上記検索(2)と同様の方法で強制水泳試験を行って無動時間を測定し、他の抗うつ薬投与時と比較検討した。

(5) 脳サンプル中のアミノ酸含量の定量：上記検索(3)で得た脳内各領域（前部帯状回、海馬、側坐核）のサンプルを用いて、興奮性・抑制性アミノ酸及び関連アミノ酸を分離し、含量を測定した。前部帯状回、海馬、側坐核のタンパクサンプルに過塩素酸-EDTA を加え、氷上で 30 分間インキュベーションした。遠心後、上清を 0.45um フィルターにかけ、HPLC-ECD で分析した。内部標準にはホモセリンを用いた。

4. 研究成果

(1) アルコール曝露による神経回路網障害を有する胎児性アルコール・スペクトラム障害モデルラットを利用して、胎児期と若年期の二重のストレスを組み合わせた難治性うつ病モデルラットを作製し、向精神薬投与による効果に関して行動薬理的に、コルチコステロン投与によるうつ病モデル群と比較検討した。

うつ病モデル動物における強制水泳試験では、セルトラリン、エスシタロプラム投与いずれの場合も、無動時間は有意に減少した。難治性うつ病モデル群においては、セルトラリン、プロナンセリン投与群では無動時間に有意な変化はなく、薬剤反応性は不良であったが、エスシタロプラム投与群でのみ無動時間の有意な減少が認められた。

Social interaction test による検討においては、難治性うつ病モデル群では対照群に比べ、社会的相互作用の時間の有意な延長を認め、病的な活動が観察された。この社会的相互作用の時間の有意な延長は、プロナンセリンの投与により改善された。エスシタロプラム投与では変化を認めなかった。最近、プロナンセリンをはじめ、一部の向精神薬が D3 受容体拮抗作用を介して認知機能や社会的機能の障害の改善をもたらすことが報告されているが、D3 受容体は側坐核や嗅結節領域に多く認められ、報酬系に重要な役割を果たすことから、社会的相互作用の効果に影響をもたらした可能性がある。

(2) 次に、うつ病モデルおよび難治性うつ病モデルにおける、血液および脳組織サンプル中の BDNF 値の変動に関する検討を行った。

通常のうつ病モデルでは、対照群と比べて血清 BDNF レベルの有意な低下がみられ、この低下は既存の抗うつ薬セルトラリン、エスシタロプラムの投与によって対照群と同レベルまでの増加が認められた。一方、難治性うつ病モデルでは、対照群と比して血清 BDNF レベルの低下はなく、むしろやや高い傾向にあった。強制水泳試験では、エスシタロプラム、プロナンセリン投与群においてのみ血清 BDNF レベルの有意な低下が認められた。

このような通常うつ病モデルとは異なった動きは、難治性うつ病モデルの側坐核における BDNF レベルの変動でも確認された。難治性うつ病モデルでは、対照群と比して、側坐核における BDNF レベルが増加しており、エスシタロプラム投与群においてのみ、この側坐核 BDNF レベルの有意な低下が認められた。

これまで、うつ病では一般に、血中や海馬の BDNF が低値で、抗うつ薬治療後に増加するとの報告が多くなされてきたが、これらは難治性うつ病を含むうつ病全般に共通する知見ではなく、抗うつ薬非反応群では血中 BDNF 変化は逆であり、動物モデルでも側坐核 BDNF 高値が報告されている。本研究において、難治性うつ病モデルでも同様に側坐核での BDNF レベルが通常のうつ病モデル動物と比して高く、治療効果が認められた場合のみ、その低下がみられた。側坐核は報酬刺激の処理・報酬予測に関係する部位で、海馬と側坐核の BDNF 不均衡は報酬系の機能異常と結びついて治療反応性/抵抗性に関与していることが示唆された。

(3) 既存の抗うつ薬 SNRI 様のセロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害作用を持つが、血中から脳内への移行性がほとんどない新規化合物 OPC-X を用いて、コルチコステロン投与うつ病モデルラットへの末梢投与の治療効果について解析を行った。強制水泳試験において、うつ病モデル群 (Dep) では対照群 (Control) と比べて有意な無動時間の延長がみられたが、OPC-X 投与により、無動時間

の有意な減少が認められた（図 1）。これは、エスシタロプラムでみられた結果と同程度の有意な減少であった。よって、これまでの概念をくつがえす、いわば脳へ行かない抗うつ薬が、既存の抗うつ薬によるものと同程度の抗うつ効果を有する可能性が示された。神経新生促進に働く因子が末梢で作用することで、末梢から中枢へボトムアップで治療的役割を果たす可能性を示唆するものであり、非常に興味深い成果が得られた。

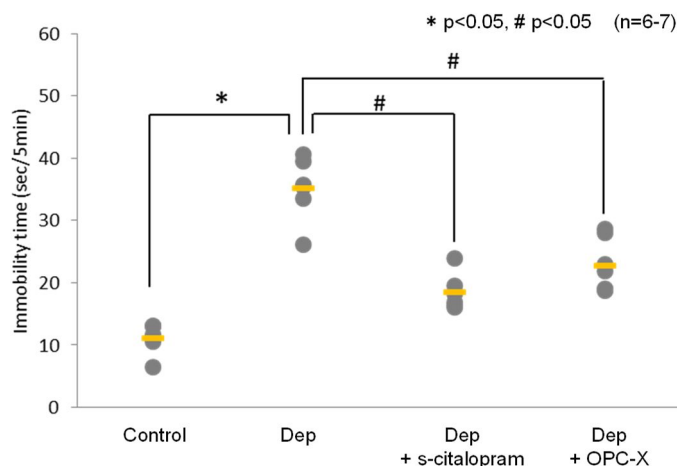


図 1 うつ病モデルに対する強制水泳試験における各薬物投与の効果

(4) 脳サンプルにおけるアミノ酸の解析では、アスパラギン酸、グルタミン酸、D-セリン、L-セリン、グルタミン、グリシン、タウリン、GABA および内部標準のホモセリンについてピーク分離ができた。各脳部位のサンプルのアミノ酸含量は、対照群、うつ病モデル群、うつ病モデル+エスシタロプラム投与群、難治性うつ病モデル群、難治性うつ病モデル+エスシタロプラム投与群群、難治性うつ病モデル+プロナンセリン投与群の6群比較で、いずれの脳部位、いずれのアミノ酸についても、有意な変化はみられなかった。対照群、うつ病モデル群、難治性うつ病モデル群の3群比較をした場合に、難治性うつ病モデル群で海馬のGABA含量の有意な増加がみられたが、エスシタロプラムおよびプロナンセリン投与による有意な変化は認められなかった。難治性うつ病の病態生理におけるGABAインターニューロンが果たす役割は明らかではないが、GABA作動性ニューロンの活性化がグルタミン酸作動性を抑制し、BDNFの産生や放出に寄与している可能性があり、脳組織内アミノ酸含量の変動に関して更に詳細な検討を重ねることで、前述の各治療的効果との関連について新たな展開につながる事が考えられる。

< 引用文献 >

Shirasaka T, Hashimoto E, Ukai W, Yoshinaga T, Ishii T, Tateno M, Saito T. Stem cell therapy: social recognition recovery in a FASD model. *Transl Psychiatry* 2012;e188.

Ishii T, Hashimoto E, Ukai W, Tateno M, Yoshinaga T, Saito S, Sohma H, Saito T. Lithium-induced suppression of transcription repressor NRSF/REST: Effects on the dysfunction of neuronal differentiation by ethanol. *Eur J Pharmacol* 2008;593:36-43.

Hashimoto E, Tayama M, Ishikawa H, Yamamoto M, Saito T. Influence of co-morbid alcohol use disorder on treatment response of depressive patients. *J Neural Transm* 2015.122:301-306, 2015.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Furuse K, Ukai W, Hashimoto E, Hashiguchi H, Kigawa Y, Ishii T, Tayama M, Deriha K, Shiraishi M, Kawanishi C.	4. 巻 247
2. 論文標題 Antidepressant activities of escitalopram and blonanserin on prenatal and adolescent combined stress-induced depression model: Possible role of neurotrophic mechanism change in serum and nucleus accumbens.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Affect Disord.	6. 最初と最後の頁 97-104
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1016/j.jad.2019.01.007.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 辻野 華子, 鶴飼 渉, 橋本 恵理 .	4. 巻 75
2. 論文標題 アルコール使用障害とうつ病 .	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 日本臨牀	6. 最初と最後の頁 1596-1600
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 橋本恵理	4. 巻 3
2. 論文標題 出生前のアルコール曝露に関する神経行動障害 .	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 別冊 日本臨牀 精神医学症候群（第2版）	6. 最初と最後の頁 132-136
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kaneta H, Ukai W, Tsujino H, Furuse K, Kigawa Y, Tayama M, Ishii T, Hashimoto E, Kawanishi C.	4. 巻 92
2. 論文標題 Antipsychotics promote GABAergic interneuron genesis in the adult rat brain: Role of heat-shock protein production.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Psychiatr Res.	6. 最初と最後の頁 108-118
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jpsuchires.2017.03.008.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Ukai W, Tsujino H, Kigawa Y, Tayama M, Deriha K, Furuse K, Ishii T, Hashimoto E, Kawanishi C.
2. 発表標題 Effects of antipsychotics on prenatal immune stress-induced schizophrenia: studies on social behavior and GABAergic interneuron function changes.
3. 学会等名 WFSBP Asia Pacific Regional Congress of Biological Psychiatry (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 橋本 恵理, 古瀬 研吾, 辻野 華子, 田山 真矢, 鶴飼 渉, 木川 昌康, 石井 貴男, 河西 千秋.
2. 発表標題 難治性うつ病モデルに対する抗うつ薬・非定型抗精神病薬の効果 行動と血中・脳中BDNFレベルの関連解析.
3. 学会等名 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
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	山田 美佐 (YAMADA Misa) (10384182)	国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・精神保健研究所 精神薬理研究部・科研費研究員 (82611)	
研究分担者	鶴飼 渉 (UKAI Wataru) (40381256)	札幌医科大学・医療人育成センター・准教授 (20101)	
研究分担者	木川 昌康 (KIGAWA Yoshiyasu) (50581146)	札幌医科大学・医学部・助教 (20101)	

6. 研究組織 (つづき)

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	古瀬 研吾 (FURUSE Kengo)		
研究協力者	出利葉 健太 (DERIHA Kenta)		
研究協力者	辻野 華子 (TSUJINO Hanako)		
研究協力者	西村 恵美 (NISHIMURA Emi)		
連携研究者	岩本 和也 (IWAMOTO Kazuya) (40342753)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・教授 (17401)	