

令和元年5月27日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16389

研究課題名(和文) 難治性うつ病の脳個別解析 - 脳由来小胞を用いた異常ニューロン種の特特定から -

研究課題名(英文) Individual brain analysis of refractory depression-identification of abnormal neuron species using brain-derived exosomes-

研究代表者

古瀬 研吾 (Furuse, Kengo)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：60608214

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)：治療反応性が高いうつ病と、診断・治療が困難な難治性うつ病の病態について、血液中/うつ病関連脳領域中のBDNF変動に焦点を当て検討を行った。抗うつ薬sertralineおよびescitalopramは、青年期corticosterone慢性投与によるうつ病モデルのうつ病行動を減弱させた。一方、胎生期アルコール曝露を組み合わせて作成した二重ストレス誘発うつ病モデルでは、escitalopramのみが抗うつ効果を示した。また、うつ病モデルでは、血中および海馬のBDNF低下の回復が、一方、難治性うつ病モデルでは、海馬のBDNF低下の回復と、血中および側坐核のBDNFの減少が抗うつ効果と関係していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

実臨床において、うつ病の診断基準を満たしたとしても、その中には多彩な類型が含まれており生物学的背景を異にするものが混在していると考えられる。例えば、双極性うつ病、パーソナリティ障害やアルコール依存、胎生期あるいは幼少期の劣悪な環境を背景としたもの、高齢者の変性疾患に類似したものなどである。本課題では、うつ病の中核群について単一的に原因を求めるものではなく、うつ病症状を一種の動態、振舞いとして捉え直し、“神経活動に基づくBDNF発現の脳内局在”からうつ病の多様性を探究することを目指し、うつ病モデルと、臨床知見に基づく難治性のうつ病モデルを作成して病態の比較解析を実施する。

研究成果の概要(英文)：We have conducted comparative analysis of pathophysiology of depression with high therapeutic response and refractory depression that is difficult to diagnose and treat, focusing on BDNF dynamic change in blood / depression related brain regions. The antidepressants sertraline and escitalopram attenuated the depressive behavior in the depression model rat which was induced by chronic adolescent corticosterone administration. On the other hand, in the refractory depression model rat induced by combining adolescent corticosterone administration and embryonic alcohol exposure, escitalopram but not sertraline indicated an antidepressant effect. In addition, in the depression model rat, the recovery of BDNF decline in blood and hippocampus was related to the antidepressant effect of antidepressants, and recoveries of decreased BDNF in blood and nucleus accumbens were related to the antidepressant action in the refractory depression model rat.

研究分野：精神医学

キーワード：うつ病 難治性うつ病 BDNF 抗うつ薬 抗精神病薬 Brain-derived exosome 側坐核 扁桃核

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

### 1. 研究開始当初の背景

うつ病治療においては、遷延化や慢性化を呈する治療抵抗例の存在が大きな問題となっている。新規抗うつ薬の登場で、薬剤選択の幅が広がったとはいえ、患者群の寛解率が大きく上がったとは言えず、より有効性の高い治療手段と薬剤選択法の開発が強く望まれている。うつ病の生物学的研究においては、これまでに、血中、海馬、前頭葉等で、BDNF が低値であるとの報告がなされてきたが、一方で、うつ病における BDNF 発現変動は脳内領域で異なっており、例えば、側坐核ではむしろ高値になるとの報告も存在する。側坐核は脳内報酬系において重要な役割を果たしているが、行動抑制システムの高さや行動賦活システムの低さが、抑うつ症状に関連すること、側坐核や腹側被蓋野で BDNF を上昇させることによって抑うつ状態を誘導できるとの報告を含め、報酬系の機能異常とうつ病の病態との深い関わりを示す報告も増加している。

脳由来神経栄養因子 (BDNF) は、脳内のみならず血液循環系内でも検出され、その機能から、うつ病を含む精神疾患病態の生物学的指標として有望視されてきた。しかしながら、BDNF はリンパ球などの血液系の細胞の他、心筋や骨格筋等、脳以外の組織でも幅広く発現し、Ca<sup>2+</sup>結合タンパクの機能発現に関わっていることが分かっており、循環血液中の濃度そのもので脳疾患病態の詳細を予測することは極めて困難な現状となっている。

### 2. 研究の目的

アルコール曝露や虐待等、胎生期・小児期のストレスが、うつ病の難治化の要因となる可能性が指摘されている。胎生期アルコール曝露は、治療抵抗性うつ病の危険因子であり、胎児性アルコール・スペクトラム障害 (FASD) では、うつ病、躁病および不安障害を含む精神障害を高率に発症する。その生物学的メカニズムについては解明されていないが、大脳皮質、海馬および側坐核は、気分障害と FASD の両方の病態生理に関与しており、それぞれ記憶や感情において重要な役割を担っているため、責任領域の候補として上げられる。

BDNF は、神経保護や神経新生などを介して抗うつ効果に關与する。末梢血 BDNF はうつ病診断や抗うつ効果判定のバイオマーカーの候補であり、抗うつ薬によるうつ病患者の血清 BDNF 上昇が報告されている。しかし、全ての抗うつ薬が血清 BDNF を上昇させるわけではなく、抗うつ薬の反応群の方が非反応群に比べて BDNF 上昇が顕著であり、また、双極性障害患者においては、対照群よりも有意に BDNF が高いことが報告されているなど、BDNF の役割は依然として明らかではない。既に我々は、神経幹細胞の経静脈投与により、FASD モデルラットの認知機能および社会的相互作用の障害が改善すること、胎生期アルコール曝露に青年期 CORT 慢性投与を加えた難治性うつ病モデルラットの抑うつ様症状を改善することを報告してきた<sup>1,2)</sup>。両モデルでは、治療によって GABA 作動性インターニューロンの数やシナプス密度が増加することを確認しているが、血清および各種脳領域 BDNF の変化や、複数の抗うつ薬、抗精神病薬の反応性については未確認である。

今回我々は、抗うつ薬の治療反応性のメカニズムを検討するために、corticosterone (CORT) 慢性投与によるうつ病モデルと、さらに胎児期アルコール曝露を加えた難治性うつ病モデルを作成し、抗うつ薬 sertraline (Ser), escitalopram (S-Cit) と、抗精神病薬 blonanserin (Blo) を投与し、行動評価 (強制水泳試験, 社会的相互作用) と、血清中 / うつ病関連脳領域中の BDNF 変動を解析し、抗うつ薬の反応性を BDNF 動態によって説明することを試みた。

### 3. 研究の方法

#### (1) うつ病モデル、および難治性うつ病モデルラットの作成と治療薬投与

妊娠ラットを購入し、胎生期 E10 から E13 にかけて、母体に、生理食塩水を (コントロール群、および通常うつ病モデル群)、または 1 日総量 6g/kg のエタノール (難治性うつ病モデル群) を 12 時間毎 2 回に分けて経口強制投与した。それぞれの出生仔は生後 4 週齢で離乳させ、生後 70 日から 90 日の 3 週間、コントロール群には 1% tween (溶媒) を、うつ病群、および難治性うつ病群には CORT (20 mg/kg/day) を皮下注射した。治療薬は、生後 70 日から 90 日にかけて、Ser (10 mg/kg/day)、S-Cit (4 mg/kg/day)、Blo (1 mg/kg/day) をそれぞれ腹腔内投与した (Fig. 1)。

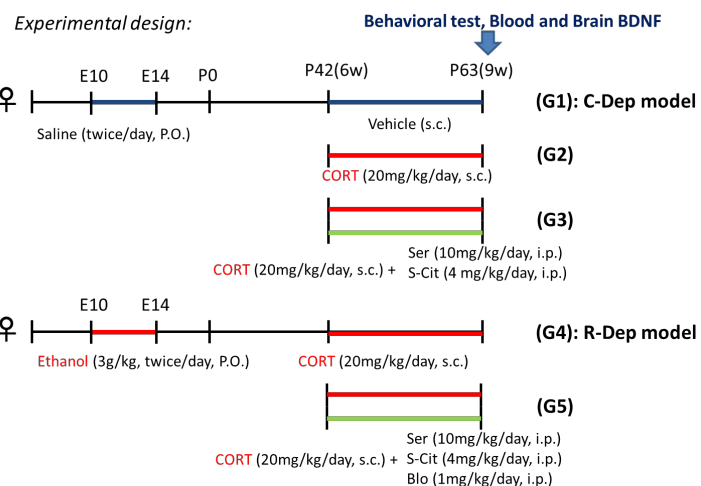


Fig. 1. Experimental design, behavior, and BDNF evaluations.

#### (2) 行動薬理学的解析

### 強制水泳試験

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計測評価した。試験は円柱状の水槽を用いて行い,水位は 30cm,水温は  $25 \pm 1$  に保持して実施した。

### 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。前日に試験ラットをオープンフィールドに入れ,30 分間の馴化を行った。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,試験ラットとともにオープンフィールドに入れた。試験の評価は,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て行った。

### (3) 血清中・関連脳領域の BDNF 測定

行動薬理学的評価の終了後,ラットを麻酔科で採血後,断頭を行った。血液は 30 分間の静置後に血清を分離した。脳については,前部帯状回,海馬,および側坐核の各脳組織をパンチングにて採取後,RIPA Lysis Buffer(Santa Cruz)に溶解してサンプルを作成した。BDNF 測定は Quantikine ELISA (R&D Systems)を用い,血清サンプルと共に測定評価した。

## 4. 研究成果

### (1) うつ病モデル,難治性うつ病モデルの妥当性

強制水泳試験において,青年期に CORT を慢性投与したうつ病モデル群では,健常群と比べ,無動時間が約 2 倍に延長した。一方,二重ストレスによる難治性うつ病モデル群では,うつ病モデル群と比べ,無動時間が,さらに約 1.6 倍に延長した(健常群  $19 \pm 6.6$ ,うつ病群  $41 \pm 9.0$ ,難治性うつ病群  $64 \pm 19.6$  秒/5 分)(Fig. 2)。

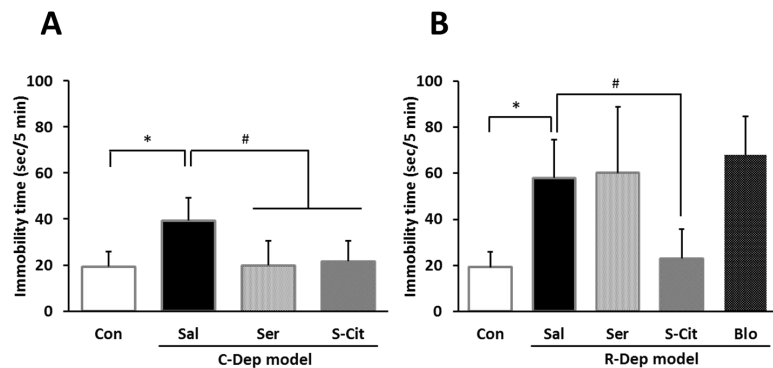


Fig. 2. Effects of Ser and S-Cit, and Blo treatment on behavioral changes in depression model rats.

### (2) うつ病モデル,および難治性うつ病モデルに対する抗うつ薬の効果

うつ病モデルで増加した強制水泳における無動時間は,抗うつ薬の Ser, S-Cit のいずれを投与した場合にも,有意に減少した(未治療群  $39 \pm 9.8$ , Ser 投与群  $20 \pm 10.8$ , S-Cit 投与群  $22 \pm 8.9$  秒/5 分)。一方,難治性うつ病モデルでは,抗うつ薬の Ser, および抗精神病薬の Blo とよ群では無動時間に影響は認めず,抗うつ薬の S-Cit 投与群でのみ,無動時間が約 1/2 に減少した(難うつ性うつ病群  $58 \pm 16.7$ , Ser 投与群  $60 \pm 28.7$ , Blo 投与群  $68 \pm 16.8$ , S-Cit 投与群  $23 \pm 12.7$  秒/5 分)(Fig. 2)。

(3) 血清 BDNF の変化  
健常群と比較し,うつ病モデル群では,血清 BDNF 値の有意な減少を認めた(健常群  $6.2 \pm 0.8$ , CORT 投与群  $4.5 \pm 0.6$  ng/ml)。また,この減少は Ser, および S-Cit 投与により抑制された(Ser 投与群  $6.9 \pm 1.3$ , S-Cit 投与群  $6.5 \pm 1.2$  ng/ml)。一方,難治性うつ病モデル群では,血清 BDNF はやや高い傾向にあり(難治性うつ病群  $6.3 \pm 1.0$  ng/ml), S-Cit 投与群, 及び Blo 投与群では,これが有意に減少していた(S-Cit 投与群 4.0

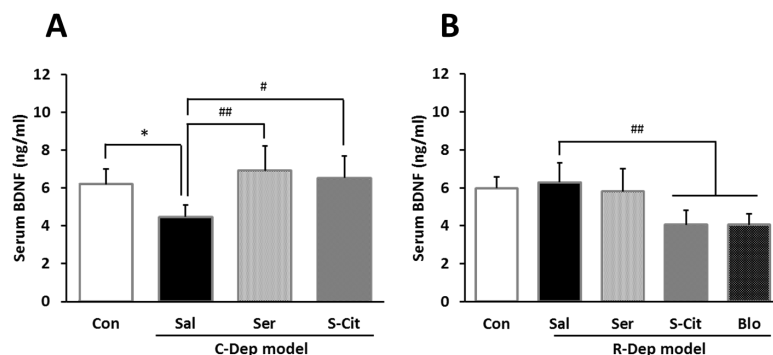


Fig. 3. Effects of Ser, S-Cit, and Blo treatment on serum BDNF levels changes in depression model rats.

±0.8, Blo 投与群 4.0±0.6, Ser 投与群 5.8±1.2 ng/ml)(Fig. 3)。

(4) 海馬, 前部帯状回, 側坐核における BDNF の変化

うつ病モデルでは, Ser, および S-Cit 投与によって海馬 BDNF の有意な増加が認められた。また, 前部帯状回でも, BDNF の有意な低下を認めたが, これについては, Ser 投与群, および S-Cit 投与群のいずれにおいても影響は認められなかった。一方, 難治性うつ病モデルでは, 海馬, 前部帯状回についてはうつ病モデルと同様の変化を認めた。特にこのモデルでは, 側坐核 BDNF が増加する傾向があり, S-Cit 投与群でのみ, その変化が有意に減弱した。

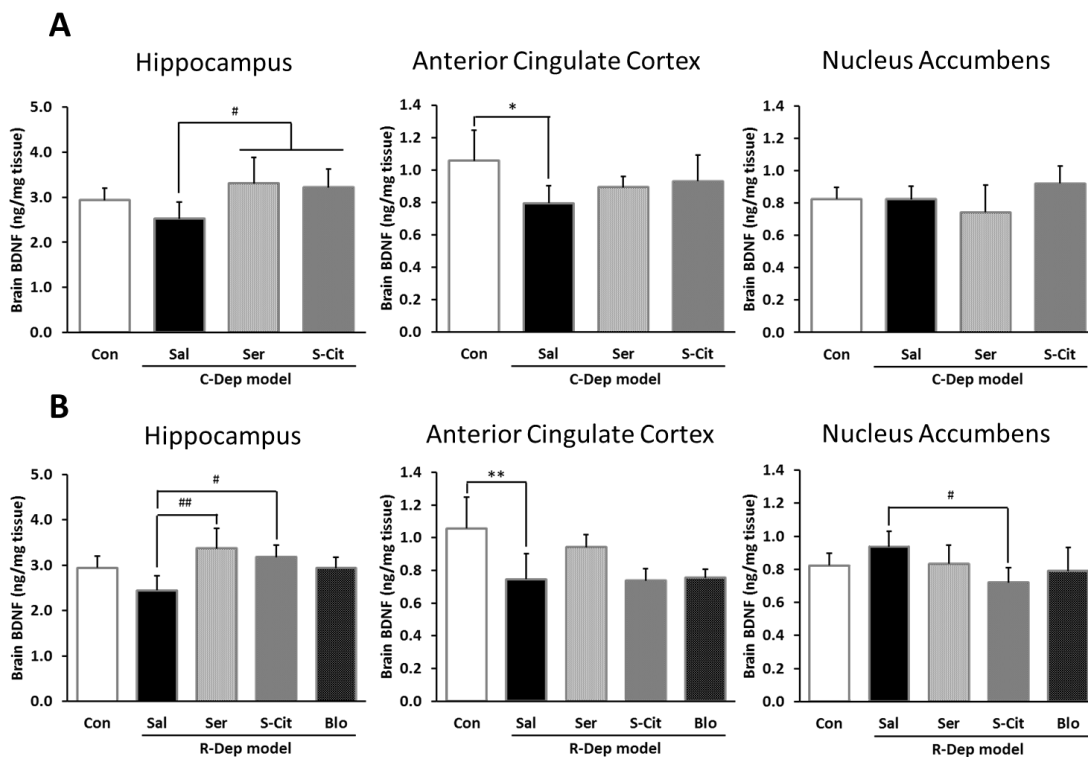


Fig. 4. Effects of Ser, S-Cit, and Blo treatment on brain regional BDNF level changes in depression model rats.

(5) 難治性うつ病モデルに対する Blo 投与の効果: social interaction test の評価より

うつ病モデルの症状評価尺度として社会性機能の変化を解析する目的で, social interaction test を実施した。その結果, 難治性うつ病モデルでは, 社会的相互作用行動の回数と時間の有意な増加を認めた (健常群: 回数 20 ± 2.0 回/10 分, 時間 117 ± 25.0 秒/10 分, 難治性うつ病群: 回数 26 ± 2.7 回/10 分, 時間 166 ± 19.4 秒/10 分)。一方, Blo 投与群では, 難治性うつ病群で増加した社会的相互作用行動を, 健常群のレベルへ正常化させた。また, S-Cit 投与群ではこのような変化は認められなかった (Blo 投与群: 回数 18 ± 1.8 回/10 分, 時間 124 ± 8.7 秒/10 分, S-Cit 投与群: 回数 24 ± 4.0 回/10 分, 時間 151 ± 9.0 秒/10 分)(Fig. 5)。

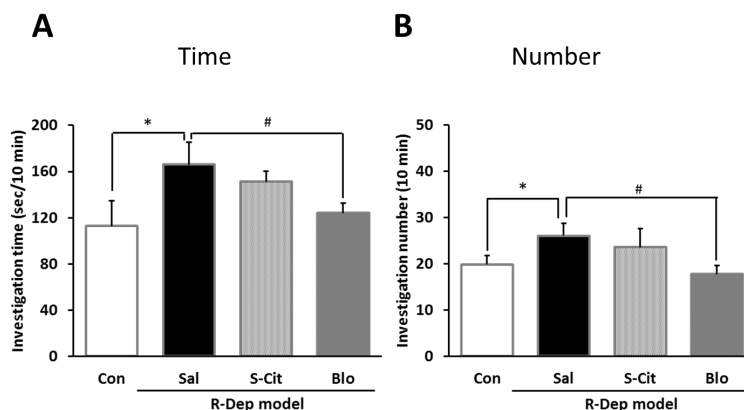


Fig. 5. Blo treatment reverses abnormal social interaction behavior in R-Dep model rats.

また, S-Cit 投与群ではこのような変化は認められなかった (Blo 投与群: 回数 18 ± 1.8 回/10 分, 時間 124 ± 8.7 秒/10 分, S-Cit 投与群: 回数 24 ± 4.0 回/10 分, 時間 151 ± 9.0 秒/10 分)(Fig. 5)。

【考察】

本研究では、治療反応性の良いうつ病と、遷延する難治性うつ病の病態の違いを明らかにする目的で、青年期にCORTを慢性投与させたうつ病モデルと、これに加えて胎児期にアルコール暴露を実施した二重ストレス誘発難治性うつ病モデルを作成した。この二種のモデルに対して、抗うつ薬のSer, S-Cit, および抗精神病薬のBloを投与し、それぞれの処置動物の行動学的評価を行うとともに、血清、および気分障害との関連が濃厚とされる脳領域(海馬, 前部帯状回, 側坐核)のBDNFを測定し、相関関係を解析することで、抗うつ薬の反応メカニズムの一端を探ろうとした。初めに、うつ病モデルラットを用いた検討において、SerとS-Cit投与によるうつ病様行動の改善を認め、それに、血清、および海馬のBDNF正常化が関与することが示された。一方、難治性うつ病モデルでは、S-Citを投与した場合にのみ、うつ病様行動の改善が認められ、Bloによって社会相互作用行動異常の改善効果を認めた。また、S-Citによる抗うつ効果には、血清および側坐核におけるBDNF変化が重要な役割を果たしていることが示唆された。

CORT慢性投与は、海馬の神経新生を低下させ、ラットにうつ病様行動を引き起こすことが知られている。海馬の神経新生を増加させたトランスジェニックマウスでは、慢性CORT投与によってもうつ病様行動が生じないことが報告されており、本研究においてもCORT慢性投与による強制水試験における無動時間の延長と、抗うつ薬投与によるその回復と海馬のBDNF増加が確認された。

抗うつ薬の多くが、cAMPとCREBを介しBDNF発現を誘導することが知られており、BDNFシグナル伝達低下がうつ病の病態生理に関連すると示唆されている。これに関連して、我々は、血清BDNFの減少が血小板からのBDNF放出減少に起因することを報告している<sup>3)</sup>。また、難治性うつ病モデルラットにおいて、前部帯状回、扁桃体、海馬のPV陽性GABAインターニューロンが減少していることを見出し、報告している<sup>2)</sup>。この知見からは、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考えられる。一方、臨床研究では、我々は、うつ病とアルコール使用障害の併存が抑うつ症状をより重篤化し、治療抵抗性であることを報告した<sup>4)</sup>。

今回の検討で、S-Citの投与が難治性うつ病モデルの血清BDNFを低下させ、抑うつ様症状を改善させたが、これについては、中脳辺縁系ドーパミン経路に対するBDNFの作用によって説明することが可能かもしれない。PTSD患者の血清BDNF変化とS-Citの反応をみた臨床試験の結果では、PTSDに併存する抑うつ様症状が大幅に改善し、血清BDNF低値は強い治療予測因子であったとの報告がある。中脳脊髄ドーパミン経路には、中脳腹側被蓋野と側坐核への投射があり、側坐核へのドーパミン作動性シグナル伝達は、社会環境からの脅威に対する応答に関与すると言われており、BDNF活性化は側坐核におけるドーパミン放出を促進し、社会回避行動を引き起こすことが報告されている。さらに、腹側被蓋野側坐核経路におけるBDNF活性の阻害は、齧歯類において社会敗北ストレスに対する抗うつ様効果をもたらすことも報告されている。これらの知見は、本研究で、S-Cit投与が側坐核のBDNF低下をもたらし、これが、複雑で難治化したうつ病病態においても抗うつ様効果を発揮したと関係しているのかもしれない。

また、Bloの投与は、難治性うつ病モデルにおける社会的相互作用行動異常を改善させ、S-Citと同様に血清BDNFを低下させた。しかしながら、S-Citとは異なり強制水泳試験では抗うつ様効果を認めなかった。残念ながら、Blo投与の効果に関しては、血清BDNFと相関する特定の脳領域は同定できなかった。最近の報告では、BloやカリブラジンはD3受容体拮抗作用を介して統合失調症および双極性障害における認知機能・社会機能障害の改善をもたらすと言われており、D3受容体は嗅結節領域に多く認め、報酬系にとって重要な役割を果たすことから、本研究の社会的相互作用への効果に影響をもたらした可能性がある。

以上、本研究では、うつ病モデル、および難治性うつ病モデルにおいて、抗うつ薬・抗精神病薬が引き起こす血清および各脳領域BDNFの変化について詳細な解析を実施した。当初予定していた血中のneuronal exosomeを用いた異常神経細胞フェノタイプの同定までには至らなかったが、難治性うつ病の病態とその改善に、血清と側坐核のBDNFの低下が必要であることが示唆されたことから、新たな難治性うつ病の解明に向けたアプローチの糸口として、本知見を次のさらなる解析に活かしていきたいと考えている。

#### <引用文献>

- 1) 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;2:e188
- 2) Kigawa Y, Hashimoto E, Ukai W, Ishii T, Furuse K, Tsujino H, Shirasaka T, Saito T. Stem cell therapy: a new approach to the treatment of refractory depression. *J Neural Transm*. 2014;121:1221-1232
- 3) Watanabe K, Hashimoto E, Ukai W, Ishii T, Yoshinaga T, Ono T, Tateno M, Watanabe I, Shirasaka T, Saito S, Saito T. Effect of antidepressants on brain-derived neurotrophic factor (BDNF) release from platelets in the rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2010;34:1450-1454
- 4) Hashimoto E, Tayama M, Ishikawa H, Yamamoto M, Saito T. Influence of comorbid alcohol use disorder on treatment response of depressive patients. *J Neural Transm*. 2015;122(2):301-306

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計4件)

Furuse K, Ukai W, Hashimoto E, Hashiguchi H, Kigawa Y, Ishii T, Tayama M, Deriha K, Shiraishi M, Kawanishi C. 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. J Affect Disord 247; 2019:97-104

鵜飼渉, 辻野華子, 杉村政樹, 木川昌康, 田山真矢, 石井貴男, 古瀬研吾, 廣瀬奨真, 橋本恵理, 澤田いずみ, 山本武志, 白鳥正典, 河西千秋, 相馬仁. 深い学びの要 ディープコミュニケーションとは何か: どこどこで会話をしているのか(総説). 医療人育成センター紀要 9, 2018, 35-43

Kaneta H, Ukai W, Tsujino H, Furuse K, Kigawa Y, Tayama M, Ishii T, Hashimoto E, Kawanishi C. Antipsychotics promote GABAergic interneuron genesis in the adult rat brain: Role of heat-shock protein production. J Psychiatr Res. 2017;92:108-118

橋本恵理, 田山真矢, 古瀬研吾, 河西千秋. 【うつ疾患の診断と鑑別-双極性障害を中心に】双極性障害の自殺リスクと予防. カレントセラピー 35巻5号, 2017, 457-461

### 〔学会発表〕(計3件)

Ukai W, Tsujino H, Kigawa Y, Tayama M, Deriha K, Furuse K, Nishimura E, Ishii T, Hashimoto E, Kawanishi C. Effects of antipsychotics on prenatal immune stress-induced schizophrenia: studies on social behavior and GABAergic interneuron function changes. The World Federation of Societies of Biological Psychiatry (WFSBP), Sep 7-9, 2018, Kobe

荻野裕介, 古瀬研吾, 佐藤謙太郎, 保前英希. ドパミン調節異常症候群の薬物療法: ミルタザピンが奏効した1例からの考察. 精神神経学雑誌 120巻8号 Page724 (2018.08)

橋本恵理, 古瀬研吾, 辻野華子, 田山真矢, 鵜飼渉, 木川昌康, 石井貴男, 河西千秋. 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. 日本生物学的精神医学会・日本神経精神薬理学会合同年会 抄録集 39回・47回 Page161 (2017.09)

### 〔図書〕(計0件)

### 〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

### 〔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:

ローマ字氏名:

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。