

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：35303

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K15500

研究課題名（和文）うつ病の発症メカニズムの解明 - リアノジン受容体およびIP3受容体の関与

研究課題名（英文）Elucidation of the pathogenic mechanism of depression - involvement of ryanodine receptors and IP3 receptor.

研究代表者

丸山 恵美 (Maruyama, Emi)

川崎医科大学・医学部・助教

研究者番号：30792072

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は抗うつ薬の新しい標的となり得るかを示すことを目的としてうつ様モデルマウスの中枢神経系におけるリアノジン受容体（RyRs）およびIP3受容体（IP3R）の発現と機能の変化を調べた。海馬でRyRsの蛋白発現量が有意に増加し、電気痙攣ショック（ECS）によるうつ様症状の改善とともに減少した。IP3Rでは有意な変化が見られなかった。またRyRsの拮抗薬でうつ様症状の増悪が確認され、ECSの抗うつ効果も減弱された。うつ様時はRyRs経路Ca²⁺放出も減少したがECSによって回復した。これらの結果からうつ病の発症および改善にRyRsのCa²⁺放出機能が関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はうつ病に最も有効な治療の一つである電気けいれん療法（ECT）の作用機序を調べることで薬物療法（抗うつ薬）への転換を図るものである。現行の抗うつ薬の有効性はさほど高くなく、ECTは処置病院にある程度の規模を要する。よって有効性の高い抗うつ薬に転換できればより多くの治療が可能となる。今回うつ状態で海馬のリアノジン受容体に変化が見られたことから中枢神経系におけるリアノジン受容体の機能回復が新薬の標的となり得る可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：This study examined changes in the expression and function of ryanodine receptors (RyRs) and IP3 receptor (IP3R) in the central nervous system of a depression-like model mice, with the aim of demonstrating that RyRs may be a new target for antidepressant drugs. RyRs protein expression was significantly increased in the hippocampus and decreased with improvement of depressive-like symptoms induced by electroconvulsive shock (ECS), while no significant changes were observed in IP3R. RyRs antagonists exacerbated depressive-like symptoms and attenuated the antidepressant effect of ECS. Ca²⁺ release via RyRs was also decreased during depressive-like symptoms, but was restored by ECS. These results suggest that the Ca²⁺ release function of RyRs is involved in the onset and improvement of depression.

研究分野：神経生理学

キーワード：うつ 電気けいれん療法 リアノジン受容体 Ca²⁺ 海馬

1. 研究開始当初の背景

うつ病は全世界人口の約4%が発症する、ごく身近な疾病である。さらに近年では脳卒中、認知症、がん、心不全など様々な疾病の発症原因の一つとも考えられている。これまでうつ病の病態生理としてセロトニンやドーパミン等の神経伝達物質のバランス異常やBDNF等の神経栄養因子減少による神経細胞の形態学的異常など、数多く報告されている。しかし、その発症メカニズムは解明されていない部分が多い。

これまで、うつ病の発症機序として「モノアミン仮説」が最も有力であった。すなわちノルアドレナリン、セロトニン、ドーパミンの減少によってうつ病が発症する、という仮説である。この仮説を元に、1999年、シナプス間のセロトニン濃度をコントロールすることで抑うつを改善するSSRI(選択的セロトニン再取り込み阻害剤)が誕生し、以降うつ病の薬物治療は飛躍的に進んだ。しかし抗うつ薬が効かない、または副作用が強すぎて服用できないなど、薬物治療が困難な患者は今も多い。また、脳損傷後うつなどは抗うつ薬を処方するとさらに抑うつが悪化することも多いことから、ストレスによるうつ病よりもコントロールが難しいことが知られている。

よって、現行の抗うつ薬とは異なった作用機序を持つ、様々なうつ病患者に普遍的に有効である抗うつ薬の開発が重要であると考えられている。そのためにはうつ病の発症メカニズムを解明することで、新たな創薬のターゲットを見出すことが必要である。

2. 研究の目的

本研究はうつ病とCa²⁺シグナル経路との関連を主軸としてうつ病の発症メカニズムの一部を解明し、創薬のターゲットを探ることを目的とする。

Ca²⁺は細胞活動における最も重要なセカンドメッセンジャーの一つである。神経伝達物質や神経栄養因子など数多くの経路が細胞内Ca²⁺濃度の上昇から始まる。そしてCa²⁺シグナル経路の異常は様々な精神疾患に関与していることも多く知られている。うつ病においてもCa²⁺との関連性は示唆されている。細胞内Ca²⁺濃度はリアノジン受容体(RyRs)およびイノシトール1,4,5-三リン酸受容体(IP₃R)を経由した小胞体からのCa²⁺放出によって調節されている。どちらの受容体もCa²⁺シグナル経路のスタートに重要な役割を担っているにもかかわらず、うつ病との関連についての報告はほとんどない。

そこで、本研究ではCa²⁺シグナル経路に重要なRyRsおよびIP₃Rのうつ状態での発現および機能変化を調べ、RyRsやIP₃Rが抗うつ薬の新しいターゲットとなり得るかを示すことを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では中枢神経系のうちうつ病患者において最も変化が見られる部位の一つである海馬を解析した。

(1) うつ様モデルマウスの作成

C57BL/6J(、7w)を50ml遠沈管に拘束し、27℃の水に3-7時間、連続15日間浸けて拘束水浸ストレス負荷モデルを作成した(Hashikawa et al, 2015)。うつ様状態は行動学的(強制水泳試験、自発運動量、新奇環境摂食抑制試験)に評価した。またモデル完成後から5-bromo-2-deoxyuridine(BrdU)を連続投与し、DCXと二重染色することで海馬歯状回における神経新生細胞数を計測することで組織学的にも評価した。

(2) 電気けいれんショック(ECS)

ECSはペントバルビタール麻酔下で耳電極を装着し、80 Hz、30 mA、0.5 ms pulse、1.2 s(Weber et al, 2013)で1回/日、10日/2週間施した。

(3) RyRsおよびIP₃Rの発現量の検討

海馬におけるRyRsおよびIP₃Rのタンパク発現量をウェスタンブロッティング法にて、mRNA量をリアルタイムRT-PCRにて測定した。

(4) RyRs拮抗薬によるうつ様症状改善の検討

モデルマウスの腹腔内にRyRsの拮抗薬(ダントロレン; 10-20mg/kg)を腹腔内投与し、うつ様行動への影響を調べた。

(5) Ca²⁺イメージングによるRyRsの機能評価

脳スライス標本を作成し、Ca²⁺感受性色素(Oregon green 488 BAPTA-1 AM)を導入したのち正立型蛍光顕微鏡に取り付けたデジタルCMOSカメラにて33フレーム/秒で撮像した。

RyRs 刺激薬としてカフェイン (4mg/ml) 200 μ l をチャンバー内に添加した直後 (最終濃度約 4mM) から約 1 分間の輝度の変化 (= Ca^{2+} 放出量の変化) を海馬歯状回顆粒細胞層にある任意の細胞ごとに計測した。灌流用の aCSF にはアデノシン 1 および 2A 受容体拮抗薬 (8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine および SCH58261、それぞれ 100nM) を予め添加しておき、実験前 10 分間スライスに作用させることでカフェインの効果を限定した。

4. 研究成果

うつ様状態でのリアノジン受容体 (RyRs) および IP_3 受容体 (IP_3R) の発現量を確認するために、拘束水浸ストレス負荷にてうつ様モデルマウスを作成し、ウェスタンブロット法にて海馬でのタンパク発現量を調べた。結果、うつ様状態では RyRs のタンパク量の増加が確認され、 IP_3R では見られなかった。そしてこの増加は電気けいれんショック (ECS) によるうつ症状の改善とともに減少した。一方 RT-PCR 法による mRNA の測定はいずれも変化がなかった。

次にこのモデルマウスに対して RyRs の拮抗薬であるダントロレンの投与実験を行い、RyRs の機能抑制がうつ様状態に与える影響を調べた。すると投与量に依存してうつ様症状の増悪が確認された。また、ダントロレンの前投与によって RyRs をブロックした状態で ECS を施すとうつ様改善効果が減弱された。これらの結果はうつ病の発症および改善に RyRs が何らかの関与があることを示す。以上の結果は論文として報告した (Brain Stimulation. 14: 36-47, 2021)。

うつ状態で RyRs のタンパク発現量が増大するにもかかわらずブロックするとうつ症状が増悪することから、RyRs の Ca^{2+} 放出能の変化の有無を検討する必要がある。よって Ca^{2+} イメージング

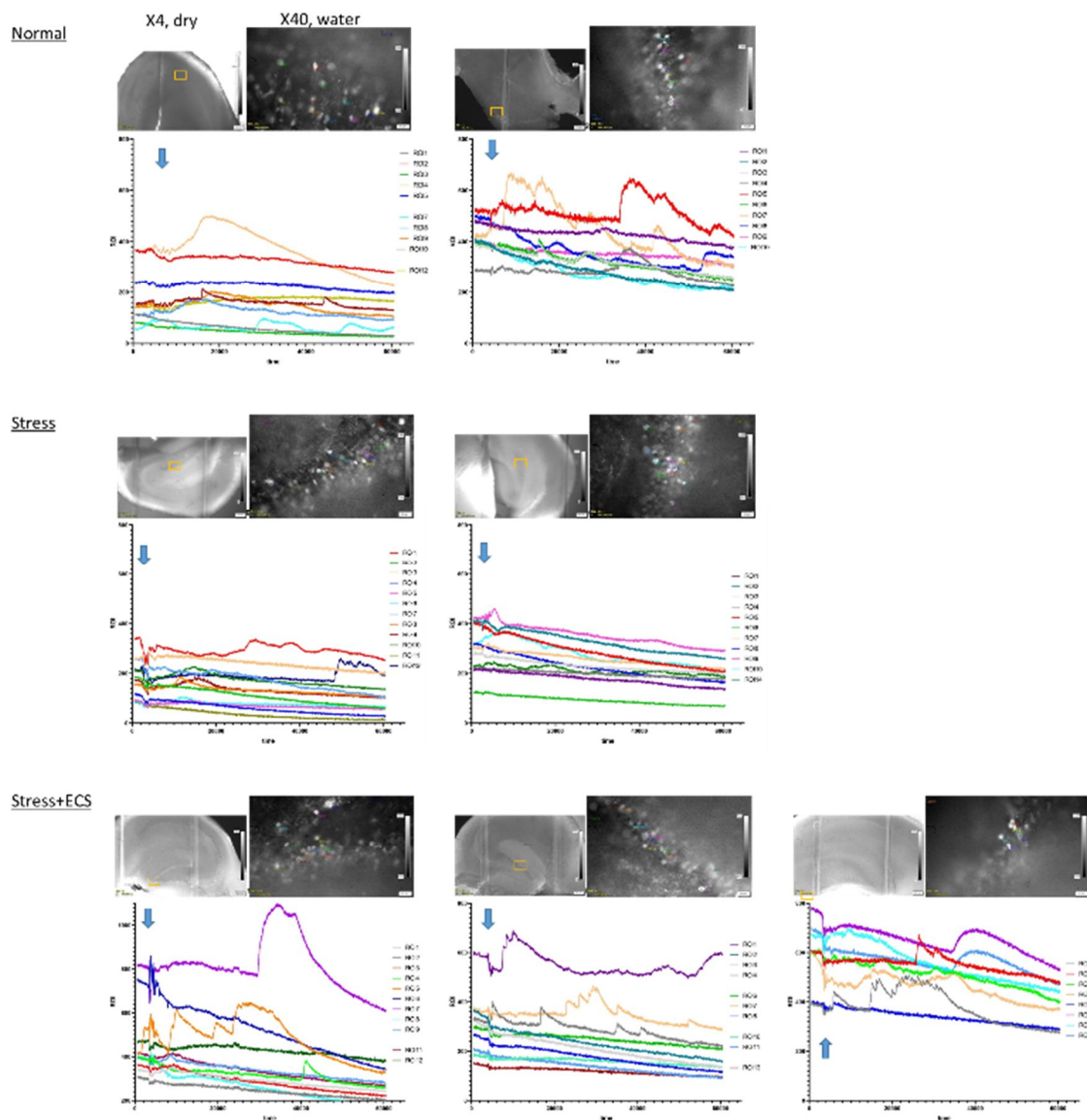


図 1 RyRs を介した Ca^{2+} 放出

測定用のシステムを構築し、RyRs のうつ様状態での機能評価を行った。Ca²⁺感受性色素は静的 Ca²⁺も検出できる Oregon green 488 BAPTA-1 AM を用いた。

海馬歯状回の錐体細胞を対象とし、輝度変化量および輝度変化パターンごとに細胞を分類し解析した。うつ様モデルマウスでは RyRs 刺激薬であるカフェインによって Ca²⁺を放出する細胞が減少し、ECS でうつ様症状が軽減すると細胞数の減少が回復した。カフェインによってオシレーションを誘発する細胞数も同様の傾向が見られた。また、Ca²⁺放出時の rise time がうつ様状態では延長、ECS 処置後では短縮した。このカフェイン誘発 Ca²⁺放出が RyRs を介したものであることを確認するために灌流液中にダントロレンを加えたときの反応の変化を細胞ごとに比較検討した。これらの結果は一貫してうつ様状態では RyRs の Ca²⁺放出機能が低下していることを示す。

以上の結果から RyRs の正常化が抗うつ効果に参与している可能性が示唆された。

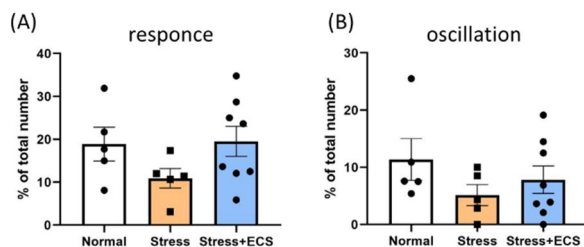


図2 記録した全細胞について群別の解析結果。(A)カフェインを添加した際に ROI が変化した (=Ca²⁺を放出した) 海馬錐体細胞の個体別割合。(B)カフェインを添加後、複数回輝度変化を示した細胞の個体別割合。

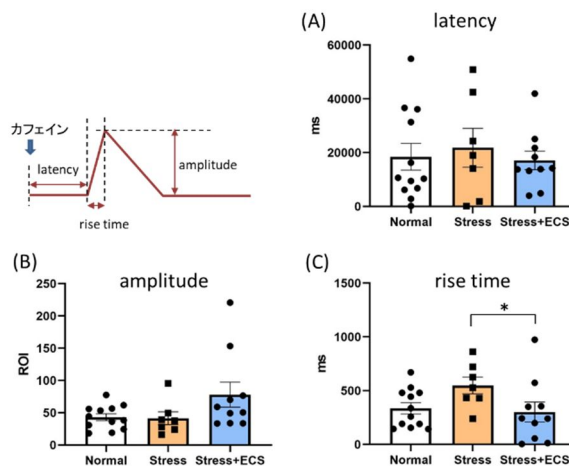


図3 カフェイン添加によって Ca²⁺を放出した細胞における Ca²⁺放出の経時変化。(A)カフェインを添加してから Ca²⁺放出が認められるまでの潜伏時。(B)輝度の変化量。(C)Ca²⁺放出がピークを迎えるまでの立ち上がり時間。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 91.Nakamura-Maruyama E, Kai R, Himi N, Okabe N, Narita K, Miyazaki T, Aoki S, Miyamoto O	4. 巻 14
2. 論文標題 Ryanodine receptors are involved in the improvement of depression-like behaviors through electroconvulsive shock in stressed mice.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Brain Stimulation	6. 最初と最後の頁 36-47
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.brs.2020.11.001.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中村(丸山)恵美、氷見直之、成田和彦、甲斐里沙、岡部直彦、宮本修
2. 発表標題 ECSによってリアノジン受容体を介したCa ²⁺ 放出は変化する。
3. 学会等名 第50 回日本神経精神薬理学会年会 第42 回日本生物学的精神医学会年会 第4 回日本精神薬学会総会・学術集会（NPBPPP 合同年会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Emi Nakamura-Maruyama, Naoyuki Himi, Kazuhiko Narita, Risa Kai, Osamu Miyamoto
2. 発表標題 The characteristics of Ca ²⁺ release via ryanodine receptors are altered in the hippocampus of depression-like model mice.
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会 / 第98回日本生理学会大会 合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Emi Nakamura-Maruyama, Naoyuki Himi, Kazuhiko Narita, Risa Kai, Naohiko Okabe, Osamu Miyamoto.
2. 発表標題 Alteration of Ca ²⁺ release via ryanodine receptors in the hippocampus of depression-like model mice.
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中村-丸山恵美、甲斐里沙、氷見直之、岡部直彦、成田和彦、宮崎哲治、青木省三、宮本修
2. 発表標題 うつ様モデルマウスにおけるECSの効果に対するリアノジン受容体の関与。
3. 学会等名 第28回日本臨床精神神経薬理学会・第48回日本神経精神薬理学会合同年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

川崎医科大学生理学2教室ホームページ http://www.kawasaki-m.ac.jp/physiology/index.html

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

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
---------	---------