

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08079

研究課題名(和文)うつ病における扁桃体の役割 -動物実験による解明-

研究課題名(英文)The role of the amygdala in depression

研究代表者

泉 剛 (IZUMI, Takeshi)

北海道医療大学・薬学部・教授

研究者番号：60312360

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)：我々は、うつ病モデルである反復拘束ストレス負荷(RS7)ラットの脳および血液で、うつ病と関連している視床下部-下垂体-副腎系、PI3K/Akt/mTOR系およびGSK3 / -カテニン/Wnt系の分子を測定した。そして、血中グルココルチコイド(GC)増加、扁桃体でのGR阻害因子FKBP5の増加およびAktのリン酸化(Ser-483)亢進、および海馬でのmTOR活性複合体であるpmTORC1のリン酸化(Ser-2448)低下の所見を見出した。GSK3 / -カテニン/Wnt系の分子は変化なかった。今後、これらの分子変化の上流と下流の変化を追及することで、うつ病の病態生理を解明したい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗うつ薬によるうつ病の回復率は60%程度であり、更に有効な治療法の開発のために、うつ病の病態解明が必要である。今回、我々はうつ病モデルラットの脳でうつ病関連分子の系統的な評価を行い、視床下部-下垂体-副腎系の調節分子であるFKBP5と、PI3K/Akt/mTOR系の分子であるAktおよびmTORC1が変化している所見を得た。今後、これらの分子変化をさらに追及し、うつ病の病態変化を解明したい。

研究成果の概要(英文)：We measured depression-associated molecules such as those involved with the hypothalamic-pituitary-adrenal system, PI3K/Akt/mTOR system and GSK3 / -catenin/Wnt system in the brains and blood of repeated restraint stress (RS7) rats, an animal model of depression. We found increased blood glucocorticoids (GC), increased FKBP5 (negative feedback regulator of GC) and increased phosphorylation of Akt (Ser-483) in the amygdala, and decreased phosphorylation of mTOR active complex mTORC1 in the hippocampus (Ser-2448). No changes in molecules involved in the GSK3 / -catenin/Wnt system were detected. In the future, we would like to clarify the pathophysiology of depression by investigating the upstream and downstream events resulting from these molecular changes.

研究分野：精神薬理学

キーワード：うつ病 動物モデル ストレス 扁桃体 FKBP5 Akt mTOR

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

両側性の扁桃体破壊により、サルは恐怖を示さなくなり、ラットでは恐怖条件付けによる不安反応が消失する。健常人の fMRI 研究では不安惹起による扁桃体の活性化が示されており、不安障害および PTSD 患者の脳機能画像研究でも扁桃体の異常を示す報告が多い。さらに、申請者らは、SSRI は扁桃体の 5-HT<sub>1A</sub> および 5-HT<sub>2A</sub> 受容体を介して抗不安作用をもたらすことを示してきた。これより、扁桃体は不安の中核であると考えられる。一方、海馬の神経新生が慢性ストレスで抑制され、抗うつ薬投与で促進されることから、「海馬の神経新生低下によってうつ病が発症する。」という神経新生仮説が提唱された。その一方で、うつ病患者は fMRI で情動刺激による扁桃体の過剰活性化を示し、この所見は抗うつ薬投与で臨床症状と平行して改善した。さらに、扁桃体の fMRI 反応を指標とする自己フィードバック訓練によってうつ病が改善することが報告されている。これより、扁桃体はうつ病の病態にも関与していると考えられる。上記のように、脳機能画像研究では、扁桃体は不安とうつ病の両方に関与することが示されている。だが、基礎的な動物実験では、扁桃体と不安の関係はよく研究されている一方、扁桃体とうつ病の関係はほとんど研究されておらず、具体的な神経メカニズムは不明である。このため、申請者らは本研究において、「うつ病における扁桃体の役割は何か?具体的な神経メカニズムは何か?」という問題を動物実験により解明することを意図した。

### 2. 研究の目的

これまで、臨床研究や気分障害治療薬の効果から、いくつかのうつ病関連分子群が見出されてきた。すなわち、モノアミン系、視床下部-下垂体-副腎 (HPA) 系、BDNF-TrkB 系、PI3K/Akt/mTOR 系、および GSK3 /  $\beta$ -カテニン/Wnt 系の分子である。以上の系は相互の関連も見出されているが、うつ病の病態の全体像は未解明である。本研究では、うつ病の動物モデルである反復拘束ストレス負荷 (RS7) ラットを用い、扁桃体を中心としたうつ病関連分子の変化を探索した。

### 3. 研究の方法

#### (1) うつ病モデル動物の作成

7 週齢雄性 Wistar/ST ラットに専用のプラスチックバッグを用いて、1 日 3 時間の拘束ストレスを 1 日あるいは 7 日間負荷した (反復拘束ストレス、RS1 あるいは RS7)。コントロール群はホームケージのまま、ストレスを負荷せずに同じ実験室に静置した。ストレスによるうつ様行動の変化は、10 週齢時に 2 日間の強制水泳試験を行い (1 日目 30 分、2 日目 15 分)、2 日目におけるうつ様行動 (immobilization) の時間的割合を計測することで評価した。また、薬物の投与は、RS7 終了から 2 週間、連日、腹腔内投与で行った。

#### (2) 血中コルチコステロンおよび ACTH の測定

10 週齢時にラットを深麻酔して断頭採血した (午前 10 時)。血漿を遠心分離し、Cayman 社のキットを用い、ELISA 法により血中コルチコステロンを測定した。ACTH は SRL 社に外注で ECLIA 法による測定を依頼した。

#### (3) 定量 PCR

10 週齢時にラットを深麻酔して断頭し、内側前頭前野 (mPFC)、背側海馬、扁桃体および視床下部をサンプリングし、QIAGEN 社のキットを用いて RNA を抽出した。Thermo Fisher 社の逆転写キットを用いて cDNA を合成した。cDNA サンプルとプライマーおよびリアルタイム PCR 用蛍光色素 (SYBR GreenER™ qPCR SuperMix Universal) を専用プレート上で混合し、リアルタイム PCR 装置 (StepOnePlus) を用いて定量 PCR を行った。

#### (4) Western blotting

10 週齢時にラットを深麻酔して断頭し、内側前頭前野 (mPFC)、背側海馬および扁桃体をサンプリングして、細胞の全分画よりタンパク質を抽出し、4-15% アガロースゲルを用いて SDS-PAGE 法によりサンプルを分離した。タンパクを PVDF メンブレンに転写した後、1 次抗体および 2 次抗体と反応させ、発光試薬によって発色させたメンブレンを X 線フィルムに感光させ、化学発光検出を行った。コントロールとしてグリセルアルデヒド 3 リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) を用いた。

#### (5) 免疫染色

10 週齢時にラットを深麻酔して 4% パラホルムアルデヒドでかん流固定し、抜脳した。クリオスタットで 30  $\mu$ m の凍結切片を作成し、1 次抗体および蛍光標識した 2 次抗体と反応させ、共焦点レーザー顕微鏡 (Eclipse TE-2000U, Nikon) で鏡検した。顕微鏡像の解析は ImageJ ソフトウェア (version 1.47, NIH) を用いて行った。

### 4. 研究成果

強制水泳試験において、RS7 群では、うつ様行動の指標である immobility が有意に増加しており、これは最終ストレス負荷から強制水泳試験施行前日までの 14 日間のエスシタロプラム (ESC、抗うつ薬) 投与によって拮抗された ( $P < 0.05$ ) (図 1A)。また、最終ストレスの 2 週間後に、RS7 群の血中コルチコステロン (10:00AM) はコントロール群に対して有意に増加してい

た (コントロール群,  $62.1 \pm 5.7$  ng/ml; RS1 群,  $76.5 \pm 5.2$  ng/ml; RS7 群,  $121.1 \pm 13.7$  ng/ml,  $n=7-8$ ,  $P<0.01$ )。視床下部 CRH mRNA および血中 ACTH は変化なかった (data not shown)。以上より、RS7 群はうつ病モデルとして妥当であると考えられた。最終ストレスの 2 週間後に施行した脳組織の western blotting では、RS7 群の扁桃体において、グルココルチコイド受容体 (GC) の阻害因子である FKBP5 が有意に増加していた ( $P<0.01$ ) (図 1C)。内側前頭前野および背側海馬では不変であった (data not shown)。また、GC はいずれの脳部位でも不変であった (data not shown)。RS7 群の扁桃体における FKBP5 増加は、ESC 投与により拮抗された (図 1D)。CRH および CRH 受容体 (CRHR1, CRHR2) の mRNA について、RS7 による脳内の発現変化を測定したが、いずれの部位でも変化はなかった (data not shown)。

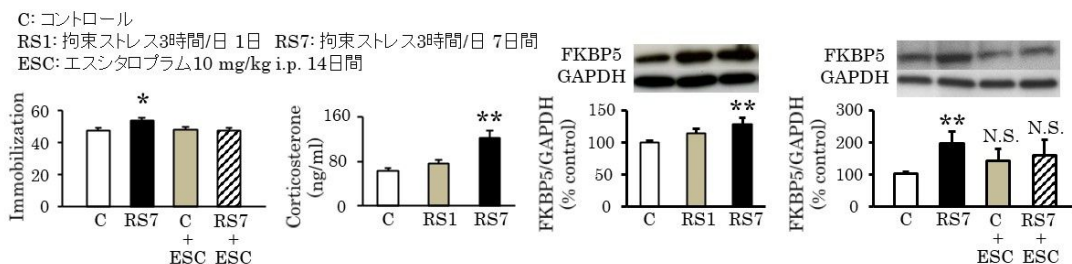


図1A 強制水泳の無動時間に対するシタロプラムの効果

図1B 血中コルチコステロン基礎値 (10:00 AM)

図1C 扁桃体のFKBP5量

図1D 扁桃体FKBP5に対するシタロプラムの効果

FKBP5 が扁桃体のいずれの亜核で増加しているかを FKBP5 の免疫染色で検討したところ、扁桃体中心核 (CeA) で、RS7 群の FKBP5 陽性細胞数がコントロール群よりも有意に増加していた ( $P<0.05$ ) (図 2)。

図2. 扁桃体中心核におけるDAPIとFKBP5の蛍光2重染色像. (A-C) コントロール群 (D-F) 反復拘束ストレス群 Bar = 50 $\mu$ m

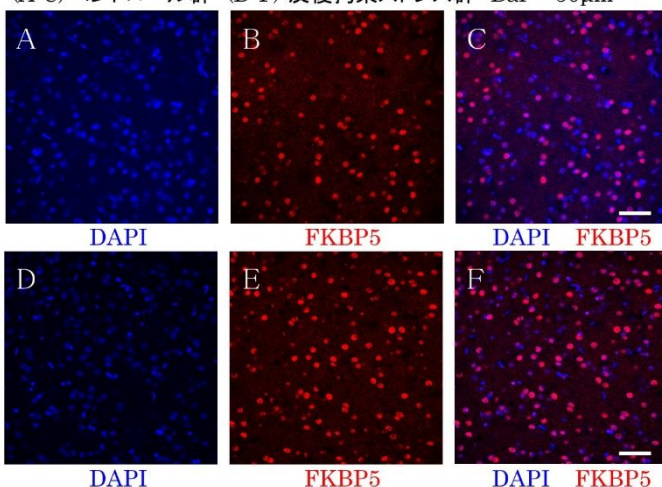
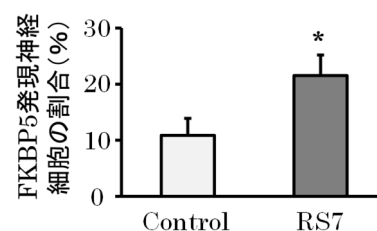


図2G. 反復拘束ストレスによる扁桃体中心核のFKBP5陽性細胞数の変化



PI3K/Akt/mTOR 系の分子では、BDNF-TrkB 系および GSK3 / -カテニン/Wnt 系とも関連している hub 分子である Akt のリン酸化が、mPFC (図 3A) および扁桃体 (図 3C) で有意に亢進していた。また、mTOR は他の分子と mTORC1 および mTORC2 という複

合体を形成して機能するが、背側海馬で mTORC1 のリン酸化が亢進していた (図 3B)。BDNF-TrkB 系および GSK3 / -カテニン/Wnt 系の分子は変化なかった (data not shown)。

今回の研究では、うつ病モデルである RS7 の扁桃体において、GC の阻害因子である FKBP5 の増加に加えて、PI3K/Akt/mTOR 系の hub 分子である Akt のリン酸化亢進が認められた。免疫染色により、FKBP5 が増加している扁桃体の亜核は CeA であることが判明した。CeA は HPA 系において CRH を分泌する視床下部の室傍核 (PVN) へ投射が存在することから、「CeA での FKBP5 増加により CeA から PVN への神経出力が増加し、CRH および ACTH 増加を経て血中グルココルチコイドが増加し、これがうつ様行動を増加させる。」という仮説を立てたが、RS7 では血中コルチコステロイドは増加しているものの、視床下部の CRH mRNA および血中 ACTH は不変であったため、この仮説は捨てて、扁桃体 FKBP5 が、直接、うつ様行動と関連している可能性を考えた。そして、RS7 の扁桃体で Akt のリン酸化が亢進しているという所見を得た。図 4 に、現在までの報告に基づき、うつ病で変化が想定されている分子系と、ストレスおよびうつ病治療薬の作用点を示し、さらに今回、RS7 の扁桃体において得られた所見を示した。これによれば、FKBP5 と Akt の間には mTOR が介在しているが、今回の研究では扁桃体で mTOR は変化していない。また、Akt の下流に位置する GSK3 も不変であった。このため、現時点では、RS7 の扁桃体における FKBP5 増加と Akt リン酸化亢進およびうつ様行動の関連を一元的に説明することはできない。今後、順行性および逆行性トレーサーを用いて、CeA の FKBP5 陽性細胞が投射している脳部位を調べる、FKBP5 とリン酸化 Akt の 2 重染色を行って、FKBP5 増加と Akt リン酸化亢進が同じ細胞で起きて

いるかどうか調べる、今回の研究ではRS7の2週間後に脳のサンプリングを行ったが、RS7の直後など、別のタイミングでもサンプリングを行って分子変化を調べる、マイクロアレイによるmRNAの網羅的解析を行い、RS7によってFKBP5やAktと関連して動いている分子がないかどうか調べる、等の方法により、さらに検討を進めたい。

また、今回の研究では、RS7のmPFCでAktのリン酸化が亢進しているという所見と、背側海馬でmTORC1のリン酸化が低下しているという所見も得られた。AktとmTORはいずれも複数の細胞内情報伝達系と関連しているhub分子であり、Aktは細胞増殖、アポトーシス抑制、グルコース代謝などに関与し、mTORC1はタンパク合成・分解、オートファジー、リソソーム形成などに関与していることが報告されている(図5)。今後、mPFCと海馬で得られた所見についても検討を進め、うつ病の病態解明につなげたい。

図3A mPFCにおける分子変化

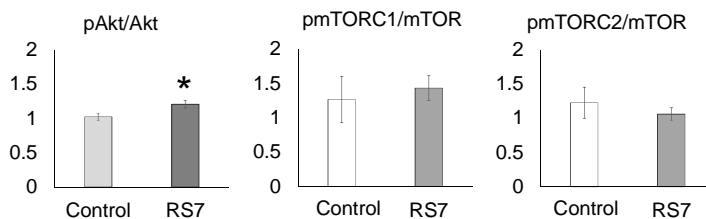


図3B 背側海馬における分子変化

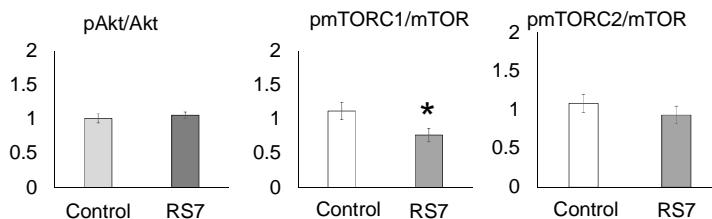


図3C 扁桃体における分子変化

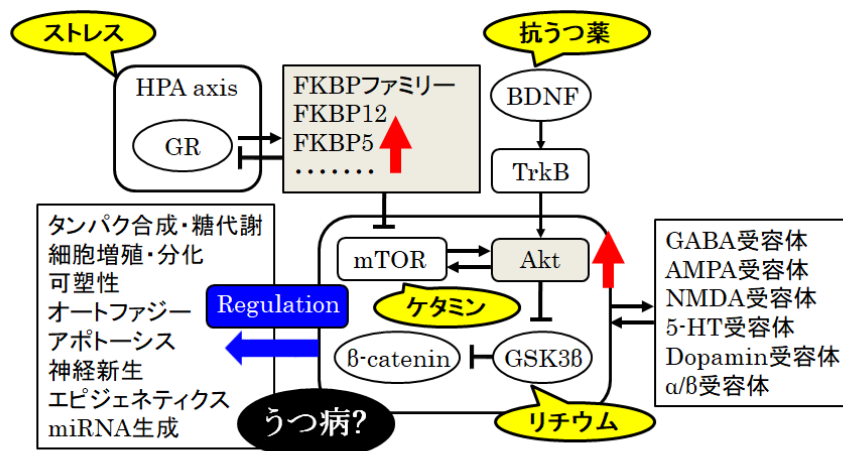
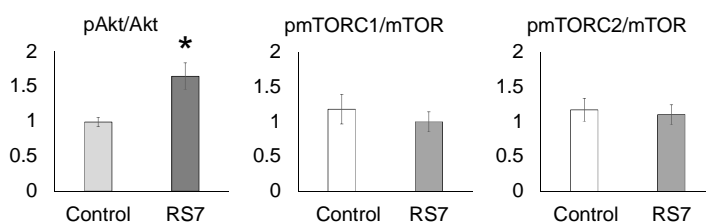


図4. うつ病で変化が想定されている分子系およびRS7の扁桃体で得られた所見(↑)

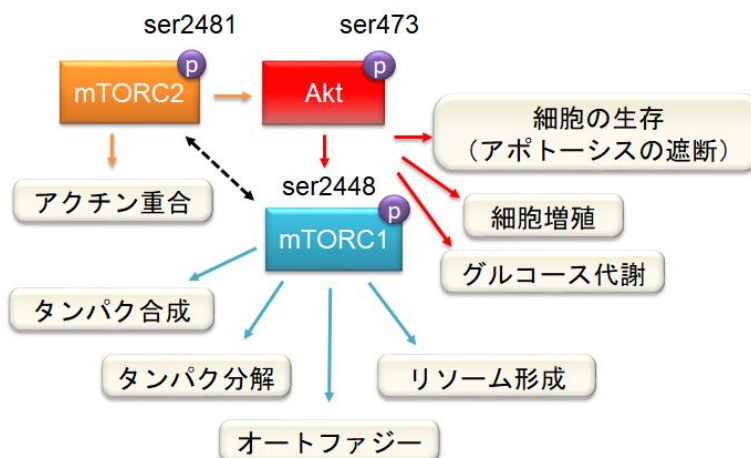


図5. Akt/mTORシグナルの機能

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Otsuka I, Akiyama M, Shirakawa O, Okazaki S, Momozawa Y, Kamatani Y, Izumi T, Numata S, Takahashi M, Boku S, Sora I, Yamamoto K, Ueno Y, Toda T, Kubo M, Hishimoto A	4. 巻 44
2. 論文標題 Genome-wide association studies identify polygenic effects for completed suicide in the Japanese population.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuropsychopharmacology	6. 最初と最後の頁 2119-2124
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41386-019-0506-5	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 -

1. 著者名 Shindo Tsugumi, Shikanai Hiroki, Watarai Akane, Hiraide Sachiko, Iizuka Kenji, Izumi Takeshi	4. 巻 923
2. 論文標題 D-serine metabolism in the medial prefrontal cortex, but not the hippocampus, is involved in AD/HD-like behaviors in SHRSP/Ezo	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 European Journal of Pharmacology	6. 最初と最後の頁 174930 - 174930
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ejphar.2022.174930	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7件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 進藤つぐみ、鹿内浩樹、高津誠也、泉 剛
2. 発表標題 うつ病モデル動物における脳内Akt-mTORシグナルの異常
3. 学会等名 第51回 日本神経精神薬理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 進藤 つぐみ、鹿内 浩樹、高津 誠也、大橋 敦子、泉 剛
2. 発表標題 うつ病モデル動物における前頭前野および皮質辺縁系Aktシグナルの異常
3. 学会等名 第68回北海道薬学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 進藤 つぐみ、脇田 征太郎、尾崎 和音、高津 誠也、鹿内 浩樹、大橋 敦子、泉 剛
2. 発表標題 うつ病モデル動物の脳内Akt-mTORおよびGSK3 系の異常解析
3. 学会等名 第34回北海道薬物作用談話会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hiroki Shikanai, Tsugumi Shindo, Sachiko Hiraide, Kenji Iizuka, Takeshi Izumi
2. 発表標題 Local injection of D-amino acid oxidase inhibitor to the prefrontal cortex improves AD/HD-like behaviors of SHRSP/Ezo.
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Izumi T, Konno K, Watanabe M, Tanaka K, Yoshida T, Shikanai H, Yoshioka M
2. 発表標題 5-HT1A and 5-HT2A receptors in the amygdala, as target molecules of the anxiolytic action of SSRIs
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鹿内浩樹、Rebel Ghebream, 吉田 隆行、菱本 明豊、吉岡 充弘、泉 剛
2. 発表標題 うつ病モデル動物における扁桃体FKBP5の発現様式
3. 学会等名 第49回日本神経精神薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Izumi T, Konno K, Watanabe M, Tanaka K, Yoshida T, Shikanai H, Yoshioka M
2. 発表標題 SSRI exerts anxiolytic effect via 5-HT1A and 5-HT2A receptors in the amygdala
3. 学会等名 Society for Neuroscience Annual Meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019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	鹿内 浩樹 (SHIKANAI Hiroki) (00632556)	北海道医療大学・薬学部・講師  (30110)	

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