

令和 5 年 5 月 19 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09341

研究課題名（和文）うつ病病態発現神経回路の解明とケタミン抗うつ作用機序の検討

研究課題名（英文）Effects of ketamine on depressive-like behaviors and prefrontal neuronal circuit

研究代表者

二階堂 義和（Nikaido, Yoshikazu）

弘前大学・医学研究科・講師

研究者番号：50613478

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）：本研究はうつ病の病態発現を制御する可能性がある内側前頭前野神経細胞群の異常神経活動をうつ病モデル動物を用いて解明し、抗うつ作用を持つ低用量ケタミンの内側前頭前野への作用を明らかにすることを目的とした。ストレス負荷によってうつ病様行動の発現したマウスの内側前頭前野では早期応答遺伝子タンパク質Arcの陽性細胞数が減少し、ケタミン投与によってその減少が抑制された。さらに、ケタミンが作用する神経細胞群をIn vivo multi-unit recordings とCa<sup>2+</sup>イメージでそれぞれ探索した結果、Arc発現興奮性神経細胞が内側前頭前野におけるケタミンの作用点である可能性を支持する結果を得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題は内側前頭前野においてうつ病の病態発現に関与する可能性がある神経細胞群の種類を推定し、抗うつ作用の臨床応用が期待される低用量ケタミンが内側前頭前野の神経活動に与える影響を明らかにした。これらの成果はうつ病病態が発現する機序の解明に加え、ケタミンを用いたうつ病新規治療戦略の基礎的な理解、安全な運用に向けた今後の研究開発に繋がる有益な情報基盤になる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the neuronal activity in the medial prefrontal cortex (mPFC) and the effect of low-dose ketamine on the mPFC neurons using chronic social defeat stress (CSDS) model mice. CSDS model mice showed depressive-like behaviors and decreased number of Arc-positive cells in the mPFC. Low-dose ketamine inhibited these behavioral and neuronal alternations of CSDS model mice. Furthermore, in vivo multi-unit recordings and Ca<sup>2+</sup> imaging demonstrated that Arc-expressing excitatory neurons in the mPFC might play essential roles in the anti-depressant effects of low-dose ketamine.

研究分野：行動神経科学

キーワード：うつ病 ケタミン Arc In vivo マルチユニット記録 In vivo Ca<sup>2+</sup>イメージング

### 1. 研究開始当初の背景

うつ病は誰でも発症する可能性のある精神疾患として知られている。これまでに即効性のある治療法は確立されておらず、薬物治療の寛解導入率は約 70% に留まっている。そのため、発症機序や病態発現機序の解明とそれらに基づく新たな治療戦略の確立が求められている。多くの基礎研究と臨床研究からうつ病の病態発現には遺伝子発現や細胞形態の異常、脳領域の活動変容が関与すると考えられている。しかし、うつ病に関わるミクロな分子生物学的機序とマクロな脳神経回路機能異常の間にあるメソスコピックな神経細胞間ネットワークの関与については明らかになっていない。また、静脈麻酔薬として使用されてきたケタミンが低用量で抗うつ作用を示すことが報告されて以来、ケタミンの臨床応用に向けて多くの研究が進められてきた。その結果、ミクロな分子・細胞メカニズムやマクロな脳領域間ネットワークへの作用は明らかにされつつあるが、メソスコピックな神経回路動態にケタミンが及ぼす影響については明らかになっていない。

### 2. 研究の目的

本研究はうつ病病態発現時にメソスコピックな神経回路が示す神経活動に対して静脈麻酔薬ケタミンがどのような影響を示すのか解析し、ケタミン抗うつ作用の発現機序を明らかにすることを目的とした。本研究では我々がこれまで注目してきた内側前頭前野(medial prefrontal cortex, mPFC)に着目し、低用量ケタミンが mPFC 神経活動に与える影響を調べた。

### 3. 研究の方法

うつ病発症の影響を受けるマウス mPFC 神経細胞の種類同定

繰返し社会的敗北ストレスを用いて C57BL/6J マウスをうつ病モデル化し、うつ病様行動を社会性試験、嗜好性試験等によって評価した。神経活動マーカーとなる早期応答遺伝子(immediate early gene, IEG)産物を蛍光免疫染色法で標識し、うつ病モデルとコントロールの IEG 発現細胞数を比較し、うつ病モデル化の影響を受けた mPFC 神経細胞の同定を目指した。また、うつ病様行動を示したマウスに低用量ケタミン投与(10 µg/mg body weight)を行い神経活動マーカーの発現数も併せて比較した。

うつ病モデル化マウス mPFC 神経細胞群の低用量ケタミン応答性の検討

繰返し社会的敗北ストレスによってうつ病モデル化した C57BL/6J マウスに対して 32ch in vivo multi-unit recordings を行い、mPFC 神経細胞群のケタミン応答性を検討した。

低用量ケタミン投与に反応する mPFC 神経細胞群の動態解明

で同定した早期応答遺伝子産物である activity-regulated cytoskeleton-associated protein (Arc)に着目し、Arc-CreERT2 マウスと AAV-DIO-GCaMP6s を用いて社会的敗北ストレスにタグ付けられた mPFC 神経細胞で GCaMP6s を発現させた。自由行動下 In vivo Ca<sup>2+</sup>イメージングを行い、Arc 発現 mPFC 神経細胞が低用量ケタミン投与時にどのような活動を示すか調べた。

### 4. 研究成果

C57BL/6J マウスに対して繰返し社会的敗北ストレスを付与した結果、うつ病様行動の発現したマウスでは mPFC 神経細胞の早期応答遺伝子タンパク質 Arc 陽性数が減少することを発見した(Figure 1)。また、社会的敗北ストレスに対して耐性を示したマウスやうつ様行動発現後にケタミンを投与したマウスでは Arc 陽性細胞数の減少は見られなかった。

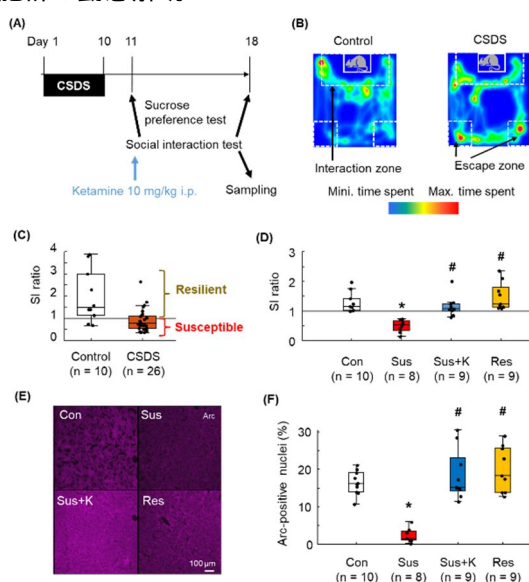
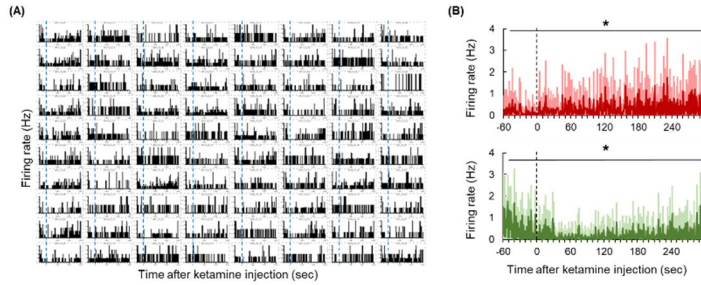


Figure 1. Effects of sub-anesthetic dose ketamine on chronic social defeat stress (CSDS)-induced social avoidance and Arc-positive mPFC cells.

(A) Schedule of the experimental procedure. (B) Schematic of social interaction test. On Day 11, CSDS mice showed SI ratio < 1 were randomly assigned to Sus or Sus+K groups. (C and D) SI ratios on Day 11 and Day 18. (E) Representative figures of Arc-positive cells in the mPFC. (F) Percentage of Arc-positive nuclei in the mPFC. \*P < 0.05, vs. Con; #P < 0.05 vs. Sus.

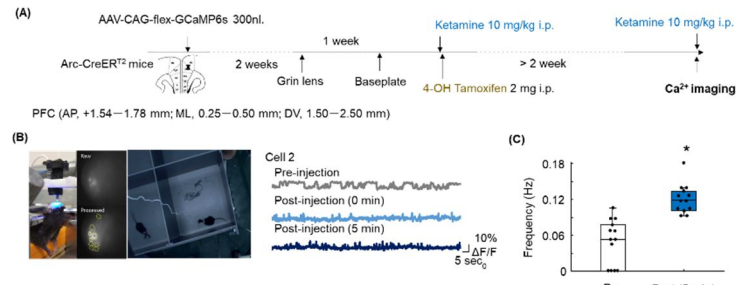
In vivo multi-unit recordings によって電気生理学的に mPFC 神経細胞のケタミン応答性を検討した結果、興奮する細胞種および抑制される細胞種の存在を確認した(Figure 2)。



**Figure 2. Two neuronal populations in the mPFC responded to a sub-anesthetic dose of ketamine.** (A) Representative peri-event time histogram of *in vivo* extracellular electrophysiological recordings from the mPFC under sevoflurane anesthesia. (B) Mean firing rates of increasing or decreasing ketamine-responsive neurons. Excitatory units,  $n = 19$ ; inhibitory units,  $n = 76$ .  $*P < 0.05$ , one-way ANOVA with repeated measures.

Arc-CreERT2 マウスの mPFC に AAV-CAG-flex-GCaMP6s を局所微量投与し、Arc 陽性神経細胞の神経活動を GCaMP6s のカルシウム依存的蛍光強度変化を指標に In vivo  $Ca^{2+}$ イメージングを行った結果、ケタミン投与によって Arc 陽性神経細胞群の活動変化を確認できた(Figure 3)。

また、これらの細胞は Parvalbumin 陽性を示さず、興奮性神経細胞であることが免疫組織化学的に示唆された。



**Figure 3. The effect of low-dose ketamine on GCaMP6s expressing Arc-positive neurons in the ACC.** (A) Schematic of the experimental procedure. GCaMP6s expressions were induced by ketamine administration. (B) After GCaMP6s induction,  $Ca^{2+}$  imaging was performed with a head-mount micro-endoscope. (C) Low-dose ketamine increased  $Ca^{2+}$  activity of Arc-positive neurons.  $*P < 0.05$ , vs. Pre-treatment.  $n = 13$ .

本研究は繰返し社会的敗北ストレスを受けたうつ病モデル化マウスの mPFC 神経細胞において Arc 発現細胞数が減少し、低用量ケタミン投与によって Arc 発現細胞数の減少が抑制されることを明らかにした。さらに、mPFC 神経細胞群のうち、ケタミン投与に対して興奮性応答を示す神経細胞に Arc 発現細胞が含まれていることも明らかにした。Arc タンパク質は不活性化シナプスに選択的に集積し、活動性の高い他のシナプスを保持するという性質を示すことが報告されており、うつ病に伴う Arc 発現低下によって mPFC Arc 発現興奮性神経細胞群のメソコピックな神経回路の効率的な情報伝達が損なわれたと考えられる。低用量ケタミン投与による Arc 発現興奮性神経細胞の活性化という結果は mPFC の効率的な情報伝達とうつ病様症状の抑制が関与することを示唆する。また、うつ病モデル作製にも使われる lipopolysaccharide (LPS)を高年齢ラットに投与した結果、新規物体に対する認知機能低下を示し、脳内鉄代謝異常が生じた可能性も明らかにした。LPS 投与および繰返し社会的敗北ストレス負荷を用いたマウス脳を用いて神経細胞数やグリア細胞数、鉄関連タンパク質発現量の変化がうつ様行動の発現やケタミンの抗うつ作用に関与するか検討を進めている。以上から、うつ病の病態発現制御に関わる mPFC 神経回路の一端を解明できる可能性を得たが、mPFC の神経細胞群がどのように細胞同士で連絡し、神経回路としてうつ病様行動やケタミンの抗うつ作用の発現を制御するのは今後も引き続き検討していく必要がある。

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 Nikaido Yoshikazu, Midorikawa Yoko, Furukawa Tomonori, Shimoyama Shuji, Takekawa Daiki, Kitayama Masato, Ueno Shinya, Kushikata Tetsuya, Hirota Kazuyoshi	4. 巻 12
2. 論文標題 The role of neutrophil gelatinase-associated lipocalin and iron homeostasis in object recognition impairment in aged sepsis-survivor rats	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 249
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-03981-7	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 二階堂 義和、光岡 杏奈、宮本 茉里奈
2. 発表標題 ケタミン抗うつ作用に関するマウスを用いた基礎的検討
3. 学会等名 第53回東北生理談話会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yoshikazu Nikaido, Yoko Midorikawa, Tetsuya Kushikata, Kazuyoshi Hirota
2. 発表標題 Effects of ketamine on chronic social defeat stress-induced depressive-like behaviors and Arc-positive cell activity of the cingulate cortex in mice
3. 学会等名 NEURO2022
4. 発表年 2022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	廣田 和美  (Hirota Kazuyoshi)  (20238413)	弘前大学・医学研究科・教授    (11101)	

6. 研究組織（つづき）

	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	榑方 哲也  (Kushikata Tetsuya)  (80250603)	弘前大学・医学研究科・准教授    (11101)	

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