

機関番号：10101

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591360

研究課題名 (和文) ストレス脆弱性の脳内分子基盤 ― 気分障害と神経細胞新生の関連に着目して ―

研究課題名 (英文) Neural mechanisms underlying stress vulnerability - involvement of neurogenesis in mood disorder

研究代表者

中川 伸 (NAKAGAWA SHIN)

北海道大学・北海道大学病院・講師

研究者番号：60360905

研究成果の概要 (和文)：本研究ではストレス脆弱性の脳内分子基盤として、成体脳海馬における神経細胞新生に着目した。抗うつ薬、気分安定薬、モノアミンにおいて気分安定薬、ノルアドレナリン、ドパミンは成体脳海馬歯状回由来の神経前駆細胞に増殖、抗アポトーシス効果、細胞運命決定効果の面で直接的な効果があった。また、抗うつ薬の治療効果に CaMKIV が神経細胞新生を介して関与する可能性を導き出した。これらの結果は新規抗うつ薬の開発に大きく貢献すると考えられる。

研究成果の概要 (英文)：In this study we took particular note of neurogenesis in the adult hippocampus as molecular basis of stress vulnerability in the brain. In vitro studies using adult rat dentate gyrus-derived precursor cells (ADP) were done to see the direct effects of antidepressants, mood stabilizers and monoamines on them. Among them, mood stabilizers, noradrenaline, and dopamine had some effects in the aspect the proliferation, apoptosis, and differentiation. In addition we found out the involvement of CaMKIV in the action of antidepressants through neurogenesis. All these findings will contribute to make novel antidepressants.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：精神薬理学

1. 研究開始当初の背景

|

臨床で使用される抗うつ薬は概ね神経細胞のシナプス間隙におけるセロトニンやノルアドレナリンを増加させる急性効果を持つ。しかし、臨床効果が見られるまでには少なくとも2～4週間を要し、この時間的乖離が抗うつ薬の効果発現機序における疑問点であった。このため、抗うつ薬に関する研究は神経伝達物質からその下流となる受容体、細胞内シグナル伝達系、遺伝子発現へと着目点移っていった。また、既存の抗うつ薬に反応しない一群、いわゆる難治性うつ病の患者群が約3割にも達することが臨床的に明らかとなり、治療手段として炭酸リチウムの付加（増強治療）や、ドパミンアゴニストの使用など従来の奏功機序の仮説では説明し得ない治療法が有効であることが判ってきた。一方、近年MRIの画像処理能力の向上とともにヒトの海馬体積がより正確に計測できるようになり、うつ病の病態として海馬体積が減少していることが判り始めた。そして、双子研究において海馬が小さい方がストレスに脆弱であるという所見が発表されるなど海馬とストレス感受性・うつ病との関連が示唆されてきている。研究代表者等は情動ストレスの神経科学的基盤として扁桃体を解析すると共にうつ病の治療における効果発現機序の最終経路として、またうつ病の病態に関与するものとして成体脳の海馬における神経細胞新生(neurogenesis)に注目してきた。神経細胞は胎生期に産生され、年齢を経るごとに減少していくだけであると考えられてきたが、近年海馬を含むごく少数の脳部位では成体においても神経細胞が新生することが明らかとなっている。この新たに生み出される神経細胞は海馬下顆粒細胞層に存在する神経前駆細胞から分裂・増殖したものであり、分化の過程を経て成熟し、既

存のニューロンネットワークに組み込まれていく。このため、現在では neurogenesis が外的環境から脳への可塑的变化をもたらす重要なメカニズムであると考えられてきている。また、創出される神経細胞の数(増殖率)は環境を含む幾つかの要因で大きく変化し、中でもストレスは強力に神経細胞新生を抑制する因子である事が判ってきた。研究代表者はこれに対して抗うつ薬の慢性投与が neurogenesis を促進させることを世界に先駆けて明らかにした(Nakagawa et al, J. Neurosci. 22:3673-3682, 2002)。さらにこの機序として海馬の成熟顆粒細胞における cAMP-CREB カスケードが重要であることを見いだした。加えて抗うつ薬が新生した神経細胞の生存を促すこと、この新生神経細胞自身が成熟する過程において大きな可塑性を有することを発表した(Nakagawa et al, J. Neurosci. 22:9868-9876, 2002)。そして、現在これらの研究結果を踏まえ、うつ病(ストレス脆弱性)の脳内分子基盤、その状態への治療法などを追求している段階である。

2. 研究の目的

精神疾患の発症、再発に最も大きく関与していると考えられるストレスと神経ネットワークとの関係を追求し、精神疾患の生物学的指標、新規治療・予防方法を創造することが研究全体の構想である。本研究はこの環境因子と脳内神経基盤を結ぶものとして成体脳の海馬における神経細胞新生に着目し、気分障害の治療薬との関連を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 気分障害治療薬の海馬神経前駆細胞への直接効果の検討

気分障害薬の神経前駆細胞への直接効果

を見るために成体ラットの海馬歯状回の神経前駆細胞 (adult rat dentate gyrus-derived neural precursor cell: ADP) を単離培養し、検討した。ADP の作成は顕微鏡下で海馬歯状回を限局して切り出し、PPD 溶液による酵素処理で細胞を単離。その後、パーコール液を用いた密度勾配遠心法による目的分画を採取し、単層法にて培養を継代した。本研究では①抗うつ薬 (SSRI, SNRI, 三環系抗うつ薬など)、②セロトニン、③ノルアドレナリン、④ドパミン、⑤気分安定薬 (炭酸リチウム、バルプロ酸、カルバマゼピン、ラモトリギン) の影響を増殖能、抗アポトーシス効果、分化能 (細胞運命決定効果) の 3 点から検討した。細胞数の計測として、増殖中 (分裂中) の細胞は BrdU を用いた ELISA 法、生細胞数は Alamar Blue assay 法を用いた。また、アポトーシスの検出はスタウロスポリンによるアポトーシス誘導を行い、TUNEL 染色をし、陽性細胞数をカウントした。レチノイン酸により分化誘導された ADP に対して幼弱ニューロンのマーカーとして Tuj-1、星状膠細胞のマーカーとして GFAP を用い、各々の抗体を用いた免疫組織化学法を行い、陽性細胞数を計測し、ニューロン/グリア細胞比の検討を行った。

(2) 抗うつ薬治療カスケードにおけるカルモジュリンキナーゼ (CaMK) IV の役割の検討

CaMKIV の役割を検討するために、CaMKIV KO マウスを使用した。このマウスに SSRI であるフルオキセチンを慢性投与し、その前後に BrdU を投与。抗 BrdU 抗体を用いた免疫組織化学法により、海馬の新生神経細胞の細胞数を検討した。また、海馬における CREB、リン酸化 CREB、BDNF の発現量を Western blot 法にて計測した。

4. 研究成果

(1) 抗うつ薬並びにモノアミンの ADP への直接作用とその作用機序

現在臨床で使用されている抗うつ薬ならびに抗うつ効果に最も関与していると考えられているモノアミンであるセロトニン、ノルアドレナリンの ADP に対する増殖作用を *in vitro* で検討した。その結果、検討した抗うつ薬 (SSRI, SNRI, 三環系抗うつ薬など) の総てに増殖作用は認められなかった。また、セロトニンにも直接効果は見られなかった。一方、ノルアドレナリンは用量依存的に増殖を促進し、その作用は ADP に発現している $\beta 2$ 受容体を介することが明らかとなった。

(2) 炭酸リチウム (Li) の ADP への直接作用とその作用機序

気分障害の治療に用いられているリチウムの ADP に対する増殖作用を *in vitro* で検討した。その結果、Li 単独では増殖作用を示さなかった。一方、グルココルチコイド受容体のアゴニストであるデキサメタゾン (DEX) は ADP の増殖を抑制し、その抑制効果はリチウムにより阻害された。この阻害作用は β -catenin/TCF pathway の阻害薬である quercetin で阻害された。そして DEX と Li により核内 β -catenin 量と cyclinD1 発現量は細胞数の増加と平行して動き、相互に影響し合っていた。さらに、DEX は β -catenin の核内移行を阻害する GSK-3 β の Tyr²¹⁶ のリン酸化を増強することを明らかにした。また、Li は抗アポトーシス効果を示し、ADP のニューロンへの分化する割合を増加させることが明らかになった。

(3) その他気分安定薬 (バルプロ酸、カルバマゼピン、ラモトリギン) の直接作用

以下の事柄が明らかとなった。①バルプロ酸はデキサメタゾンによる増殖抑制を阻止

する、②カルバマゼピンはニューロンに、バルプロ酸とラモトリギンはグリア細胞により強力に分化させる、③総ての気分安定薬が抗アポトーシス効果を示す。これらの結果は、各々の薬剤における治療反応性の違いの生物学的背景を示唆するとともに、共通効果である抗アポトーシス効果については更なる検討が重要であると思われた。

(4) ドパミンの ADP への直接作用とその作用機序

難治性うつ病、双極性うつ病に対してドパミン受容体 D2 アゴニストが有効であるという知見が集積されてきている。このため、ドパミン並びにその受容体のアゴニストの ADP への増殖効果を検討した。RT-PCR により ADP には D1-5 総てのドパミン受容体の遺伝子発現が確認された。また、ドパミン自体は ADP の増殖を促進し、D1-like 受容体アゴニストである R(+)-SKF38393 も増殖を促進させた。一方、ブロモクリプチンなどの D2-like 受容体アゴニストは直接的には ADP の増殖に影響を与えなかった。

(5) CaMKIV の抗うつ薬治療カスケードの役割の検討

シナプス間隙においてセロトニン、ノルアドレナリンを増加させる従来の抗うつ薬の慢性投与は各受容体を介して、海馬顆粒細胞内の cAMP—CREB カスケード活性化し、その下流に想定されている FGF-2, BDNF などの神経栄養因子が神経細胞を増加させると考えられている。神経系において細胞内カルシウム濃度の上昇は、カルシウム/カルモジュリンが結合し、Ser/Thr 部位のリン酸化でその活動性が変化する CaMK により、多くの細胞内反応が引き起こされる。中でも CREB を直接リン酸化する CaMKIV は注目される物質である。本研究

では CaMKIV KO マウスを使用し、CaMKIV の抗うつ作用における役割を検討した。その結果①CaMKIV ノックアウトマウスにフルオキセチンを慢性投与しても神経細胞新生は促進されない、②KO マウスにおける海馬で CREB のリン酸化や BDNF の発現量が減少することを明らかとした。

本研究での知見は総て新規のものであり、抗うつ薬の作用機序を新たな観点から明らかにしたものである。新規抗うつ薬の開発に大きく貢献しうるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 15 件)

①Boku S, Nakagawa S, Masuda T, Effects of mood stabilizers on adult dentate gyrus-derived neural precursor cells. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 査読有り, vol. 35, 2011, pp. 111-117

②Inoue T, Abekawa T, Nakagawa S, Long-term naturalistic follow-up of lithium augmentation: Relevance to bipolarity. J Affect Disord., 査読有り, vol. 129, 2011, pp. 77-87

③Boku S, Nakagawa S, Masuda T, Glucocorticoids and lithium reciprocally regulate the proliferation of adult dentate gyrus-derived neural precursor cells through GSK-3 β and β -catenin/TCF pathway. Neuropsychopharmacology, 査読有り, vol. 34, 2009, pp. 805-815

[学会発表] (計 21 件)

①Nakagawa S, HPA axis abnormality and hippocampal change in depressed subjects, CINP, 2010.6.7, 香港

②中川 伸, 海馬神経細胞新生と気分障害

治療、日本精神神経学会、2010.5.22、広島
③中川 伸、神経細胞新生から見た向精神薬
の作用機序、日本臨床精神薬理学会、
2009.11.13、京都

〔図書〕（計 2 件）

Nakagawa S, Research Signpost, Possible role of
adult hippocampal neurogenesis in depression
and antidepressant action. Recent developments
on depression research., 2009, pp1-12

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中川 伸 (NAKAGAWA SHIN)

北海道大学・北海道大学病院・講師

研究者番号：60360905

(2) 研究分担者

井上 猛 (INOUE TAKSHI)

北海道大学・北海道大学病院・講師

研究者番号：70250438

(3) 連携研究者

なし