

平成23年5月20日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591367

研究課題名（和文）動物モデルを用いたうつ病の病因と治療についての研究

研究課題名（英文）Behavioral and biochemical change in animal model of depression.

研究代表者

児玉 匡史（KODAMA MASAFUMI）

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：80379726

研究成果の概要（和文）：うつ病の病因・治療に関わるとされる神経栄養因子以降の細胞内情報伝達について、動物モデルを用いた研究を行った。いくつかの経路の関与が示唆されたが、そのうちの MAPK/ERK 経路が重要であることを明らかとした。この経路の活性化を抑制することにより、行動上の抗うつ効果および抗うつ効果と関連が示唆される海馬での神経新生が抑えられた。これにより、MAPK/ERK 経路の活性化が抗うつ作用を持つ可能性が予想される。

研究成果の概要（英文）：Signal cascades activated by neurotrophic factors such as brain-derived neurotrophic factor were examined by using animal models of depression. MAPK/ERK cascade was appeared to play a key role in the mechanisms of antidepressant action. Inhibition of this cascade resulted in block of both of antidepressive behavioral change and of increase of neurogenesis in hippocampus. These results suggest that activation of MAPK/ERK may exert antidepressive effects in depressive patients.

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	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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、うつ病、神経新生、神経栄養因子、強制水泳試験

1. 研究開始当初の背景

うつ病は生涯罹患率が 20%にも上ると報

告されている、もっとも頻度の高い精神疾患のひとつである。WHO は、うつ病のもたらす

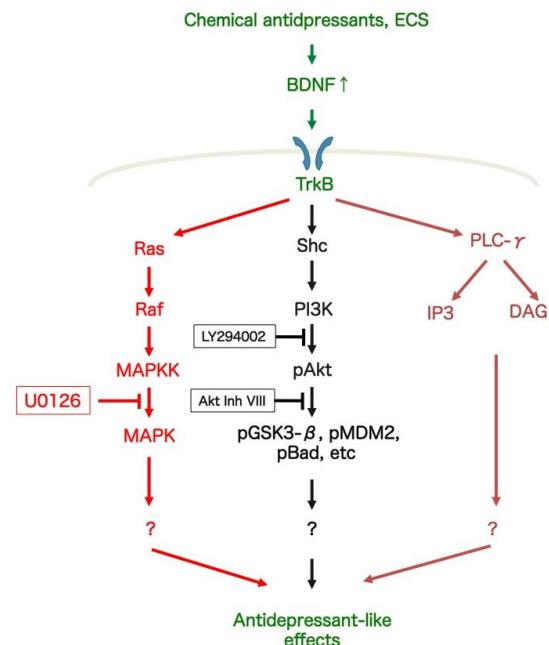
社会全体に対する経済的損失を全疾患中2位と推測しているように、その影響は個人の生活の質を低下させるのみならず、社会的、経済的に広範かつ深刻である。我が国においても毎年3万人を超える自殺者を数え、その背景に多くのうつ病患者が存在していることが指摘されている。しかしながら、うつ病の生物学的な原因は未解明であり、その治療法も不十分と言わざるを得ない。現在のうつ病治療の中心となる抗うつ薬による薬物療法の有効率は60%程度とされ、多くの難治例が存在する。また、効果発現までに数週間を要することも臨床問題となる。したがって、従来と異なる新しい作用機序を持つうつ病治療薬の開発が急務である。

近年、うつ病の神経栄養因子・神経新生仮説がYale大学精神科のDuman教授により唱えられ、支持されている。この仮説は、神経細胞の増殖、分化、可塑性に重要な役割を持つbrain-derived neurotrophic factor (BDNF)といった神経栄養因子の減少、それに続く海馬での神経新生の減少がうつ病の病因のひとつであり、これらの変化を正常化させることで抗うつ効果が発揮される、とするものである。

2. 研究の目的

BDNF以降の情報伝達系には、mitogen-activated protein kinase/ Extracellular Signal-regulated Kinase (MAPK/ERK)、phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Aktとphospholipase C- γ (PLC- γ)を介する3つの経路があることが知られている。しかし、これらのどの細胞内情報伝達経路が抗うつ作用に関与しているか不明である。これまでの抗うつ薬の限界を超える治療薬の開発のためには、抗うつ効果を得るための作用点を明らかにすることが必要である。

これにより、より効果発現が早く、副作用を示さず特異的に抗うつ効果を発揮する薬物のターゲットを絞ることが可能となる。本研究では、うつ病の病因・治療においてBDNF以降のどの情報伝達系が重要な役割を果たしているかを検証した。



3. 研究の方法

(1) 動物と処置

- ①動物；雄性8週齢のSprague-Dawleyラットを用いた。各群9-10匹。
- ②電気けいれん；クリップを用い両側耳朶より60mAの電流を0.3秒間通電することにより、強直・間代発作を得た。
- ③定量的脳内微量薬物注入；ネブターール1ml/kg腹腔内投与による麻酔下に、定量的に海馬歯状回へ1 μ lの薬物を注入した。
- ④強制水泳試験；1日目、水槽(25 x 40 cm)で15分間水泳を施行。3日後、10分間の水泳を行いビデオテープで記録する。後半5分間の無動時間、水泳時間をブラインドで測定した。

(2) 電気けいれんによる各情報伝達系の活性

化の検討

それぞれの系の電気けいれん後の活性化を検討するため、ラット海馬を用いて ERK(Tyr204)、Akt(Ser473)、PLC- γ (Tyr783) のリン酸化をウェスタンブロット法も用いて経時的に定量した。コントロール、電気けいれん後 2、10、30 分で断頭、海馬を切り出した。

(3) MAPK/ERK および PI3K/Akt 経路阻害薬の検討

MEK(MAPK) 阻害薬 U0126、PI3K 阻害薬 LY294002、Akt 阻害薬 Akt Inhibitor VIII (CALBIOCHEM) を海馬へ直接投与し、電気けいれんを施行。施行後の ERK、Akt および Akt 下流にあり、電気けいれんで活性化されることを確認した MDM2 のリン酸化抑制をウェスタンブロットで検討した。

(4) MEK(MAPK) 阻害薬投与による海馬神経新生増加への効果

① MEK(MAPK) 阻害薬 U0126 をラット海馬へ直接投与。1 時間後に電気けいれんを施行。3 日後に bromodeoxy-uridine (BrdU) を 2 回/日、3 日間腹腔内投与し、新生細胞核をラベルする。新生細胞の移動・分化のため 28 日後に還流固定を行い脳を取り出し、抗 BrdU 抗体による免疫染色を施行。光学顕微鏡下で海馬歯状回 subgranular zone の BrdU 陽性細胞数をカウントした。

② 新生細胞の分化に対する影響を調べるため、神経細胞のマーカーである抗 NeuN と抗 BrdU 抗体との二重染色後、共焦点顕微鏡での解析を行い、新生細胞への分化の割合が変化しているか検討した。

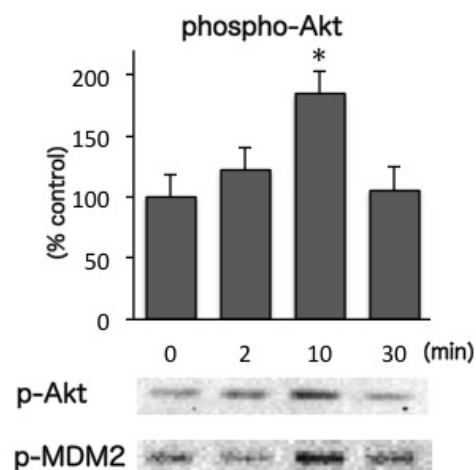
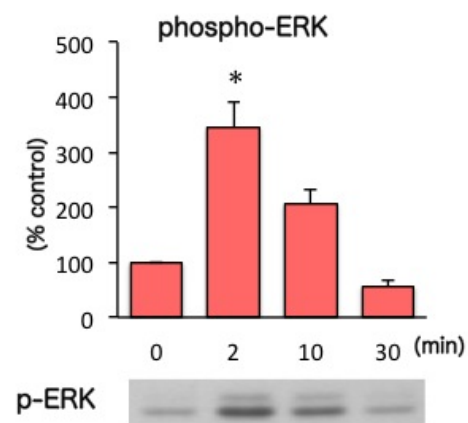
(5) MEK(MAPK) 阻害薬投与による抗うつ行動への効果

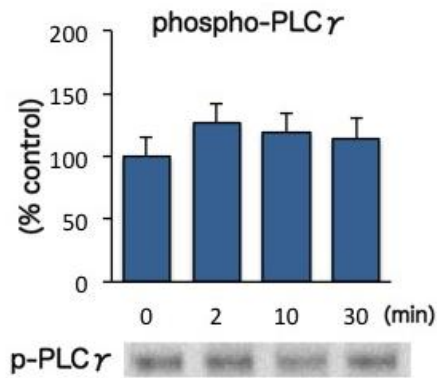
15 分間の強制水泳 2 時間後、MEK(MAPK) 阻害薬 U0126 を両側海馬に定位的に微量注入する。その 1 時間後、電気けいれん施行。3 日後に 10 分間の強制水泳を行い、抗うつ行動変化を評価した。その 2 時間後に、基礎運動量の変化を評価するため自発行動量を 1 時間測定した。

4. 研究成果

(1) 電気けいれんによる各情報伝達系の活性化

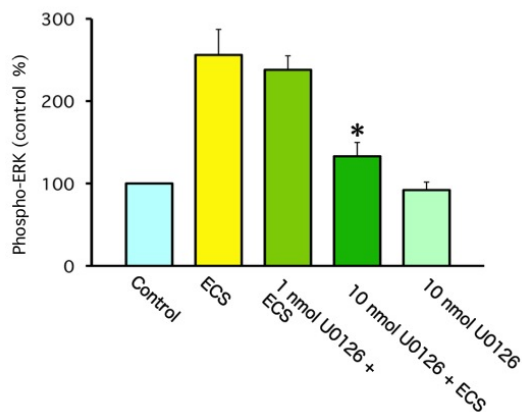
電気けいれんにより、ラット海馬では、2 分後をピークに ERK のリン酸化亢進および 10 分後をピークに Akt のリン酸化亢進を認めた。また、活性化 Akt によりリン酸化される MDM2 のリン酸化亢進も同様に認めた。しかし、PLC- γ のリン酸化は変化を認めなかった。





(2) MAPK/ERK および PI3K/Akt 経路阻害薬の検討

MEK (MAPK) 阻害薬である U0126 を海馬へ直接投与することにより、用量依存性に電気けいれんによる ERK リン酸化亢進が抑制されることを示した。U0126 を 10nmol 注入することでほぼ ERK の活性化が抑えられた。

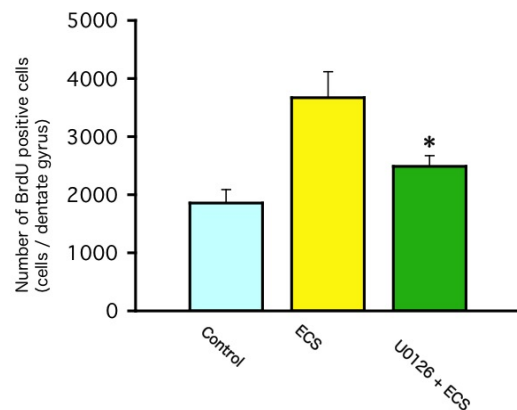
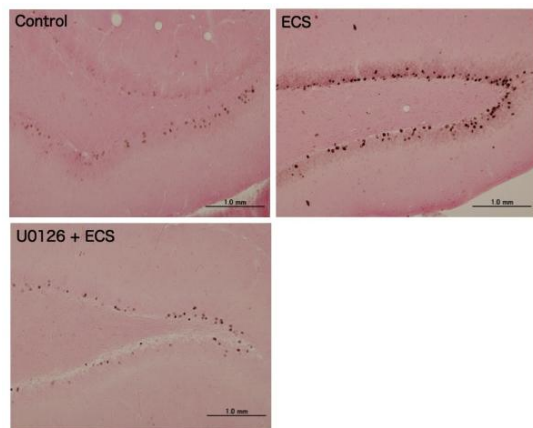


次に、PI3K の阻害薬である LY294002 を海馬内投与しその阻害効果を評価した。投与可能な最高用量 (50nmol) を用いても、電気けいれんにより引き起こされる Akt のリン酸化亢進を抑制できなかった。そこで、Akt 阻害薬を用いて、MDM2 リン酸化への効果を調べた。しかし、10nmol の Akt inhibitor VIII を用いても MDM2 のリン酸化亢進を抑制することができなかった。

(3) MEK (MAPK) 阻害薬投与による海馬神経新

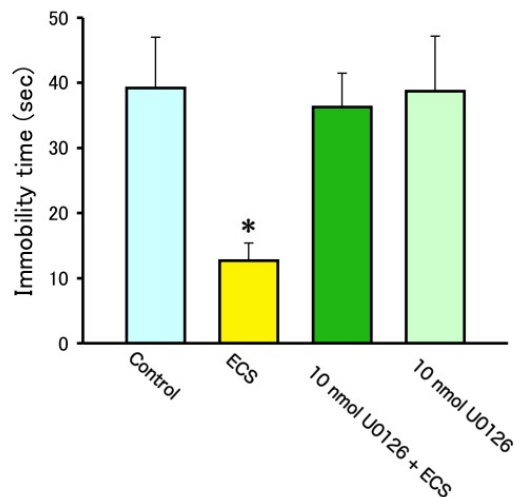
生増加への効果

単回の電気けいれんにより海馬歯状回の新生細胞数は2倍に増加していたが、U0126の前投与により、その増加は有意に抑制された。また、U0126投与反対側の海馬歯状回においては抑制を認めなかった。神経細胞マーカーである NeuN を用いた新生細胞の細胞分化に対する影響を検討では、電気けいれん、U0126 による神経細胞分化の割合に変化はなく、新生細胞の多くは神経細胞に分化していた。



(4) MEK (MAPK) 阻害薬投与による抗うつ行動への効果

電気けいれんにより強制水泳時の無動時間は、対照群と比較し短縮していた。U0126を両側海馬に前投与することにより、電気けいれんによる無動時間の短縮効果は対照群と同程度まで抑制された。一方、自発運動量は電気けいれん群、U0126前処置群でも差はなかった。



これらの結果より、抗うつ効果発現に BDNF 以降の情報伝達系の中でも MAPK/ERK 系および PI3K/Akt 系の関与が示唆された。特に、電気けいれんによる海馬歯状回の神経新生増加および行動学的な抗うつ効果発現には、MAPK/ERK 系の活性化が必須であることが明らかとなった。このことはヒトのうつ病にも MAPK/ERK 系が重要な役割を果たすことを予想させる。また、MAPK/Akt 系を特異的に活性化する薬物は、新しい抗うつ薬となる可能性を持つと考えられる。

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 2 件)

- ① 児玉匡史、モデル動物を用いた気分障害病態解析、脳と精神の科学、査読無、20巻、2009、pp. 221-228
- ② 児玉匡史、環境と神経新生 電気けいれん、Clinical Neuroscience、査読無、26巻、2008、pp. 902-904

[学会発表] (計 1 件)

- ① 児玉匡史、Activation of MAP kinase is essential for antidepressive effect by electroconvulsive seizure、Annual meeting of Society for Neuroscience、2009年10月21日、シカゴ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

児玉 匡史 (KODAMA MASAFUMI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：80379726