

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07978

研究課題名(和文) うつ病の認知機能障害に対する治療法の解明：オピオイド受容体を介した改善機序

研究課題名(英文) Understanding the treatment of cognitive dysfunction in depression: delta-opioid receptor-mediated mechanisms of improvement.

研究代表者

岩井 孝志 (Iwai, Takashi)

北里大学・薬学部・講師

研究者番号：90339135

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、抗うつ薬が効果を示さない治療抵抗性慢性ストレスモデルマウス(ACMSマウス)に対するオピオイド受容体逆作用薬SYK-623の効果について検討した。ACMSマウスにおける学習記憶障害や抑うつ様行動の誘発をSYK-623は阻害した。学習記憶やストレス応答の調節に重要な海馬において、ACMSマウスでは正常なマウスと比べてGABA神経細胞数、GABA合成酵素(GAD)発現量、GAD陽性神経線維密度が減少しており、GABA神経障害が誘導されていた。SYK-623はストレスによって誘導されるGABA神経障害を抑制し、GABA神経に対してストレスから保護する効果があることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

うつ病患者の認知機能の低下は、気分の症状と比べて治療効果が見られにくく、治療期間の長期化、再発の要因となる。本研究ではオピオイド受容体を介して、ストレスによるGABA神経障害を抑制することが、認知機能の改善に寄与する可能性を示唆した。この事により、従来の抗うつ薬とは異なるアプローチによりうつ病患者の脳機能を改善させる治療の開発につながることを期待される。さらに、認知機能と同様に、うつ病患者の寛解後も残存する睡眠障害に対しても有効性を示唆する結果が得られ、本研究の成果が、うつ病治療のさまざまな側面に波及すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the effects of the δ -opioid receptor inverse agonist SYK-623 on Antidepressant-Resistant Chronic Mild Stress (ACMS) mice, a model unresponsive to antidepressants. SYK-623 was found to inhibit the induction of learning-memory impairments and depressive-like behaviors in ACMS mice. In the hippocampus, a crucial brain region for the regulation of learning-memory and stress responses, ACMS mice demonstrated a reduction in the number of GABA neurons, the expression of GABA synthesizing enzyme (GAD), and the density of GAD-positive nerve fibers compared to normal mice, suggesting the induction of GABAergic neuronal damage. SYK-623 was shown to inhibit these stress-induced GABAergic neuronal damages and exert a protective effect on GABAergic neurons against chronic stress, providing novel insights for potential therapeutic strategies.

研究分野：精神薬理学

キーワード：うつ病 オピオイド 認知機能 GABA 海馬 ストレス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

うつ病における認知機能の障害は、抗うつ薬では十分に改善せず、治療の長期化や再発の要因になることが知られている。我が国では 100 万人がうつ病に罹患し、年間 2 万人の自殺者を出す要因の一つとなっている。このことから、気分の異常だけでなく認知機能も治療する治療薬の開発が必要である。

うつ病の認知機能改善機序に関する研究には、慢性ストレスモデル動物が使用されている。しかし、既存の慢性ストレスモデル動物の認知機能障害は、臨床で有効性が認められない抗うつ薬によって十分に改善するため、薬効予測精度は不十分である。この問題を解決するために、申請者らは chronic-mild stress モデルマウスを改変し、既存の抗うつ薬では認知機能が改善しないモデルマウスを作製した(以下 ACMS マウス)。

2. 研究の目的

申請者らは、 δ オピオイド受容体逆作動薬逆作動薬 SYK-623 が、反復拘束ストレスによる学習記憶障害を単回投与で改善することを明らかにした。この際に、海馬において FosB の発現が増加していたことから、海馬が SYK-623 の標的である可能性が示唆された。さらに、臨床に近いモデルでの薬効を評価するために ACMS モデルに対する作用を検討したところ、SYK-623 が、抗うつ作用と学習記憶改善作用を示すことを見出した。この作用機序を解明することにより、既存の抗うつ薬では改善しない症状に対しても有効性を示す治療薬の開発につながることを期待される。本研究では、海馬において δ オピオイド受容体が GABA 神経に多く発現していることから、ACMS マウスにおける GABA 神経の異常と SYK-623 の効果について検討した。

3. 研究の方法

(1) モデル動物と薬物投与

ACMS マウス：4 週間毎日、マウスに副腎皮質刺激ホルモン持続性製剤を投与した後に、ストレスを負荷することで、ACMS マウスを作製した。ストレスとして、chronic-mild stress を用いた。溶媒または SYK-623 (2 mg/kg)は、ストレス処理前に 1 日 1 回投与した。

GABA 神経破壊マウス：海馬に saporin 標識抗 GAT1 抗体 (GAT1sp) を投与し、GABA 神経に細胞死を誘導した。

(2) 行動試験

ACMS マウスの抑うつ様行動を調べるために、尾懸垂試験、ショ糖嗜好試験、学習記憶を試験するために Y-maze 試験、modified Y-maze、不安様行動を調べるために、高架式十字迷路試験を行った。

(4) 睡眠測定

行動実験とは異なる集団に対して、海馬にステンレス記録電極、僧帽筋に筋電位電極を刺入し、手術 1 週間後に海馬局所電位 (LFP) および筋電図 (EMG) を測定した。測定中は、円筒のケージ内で自由に行動させた。筋電位の積分値と海馬 LFP のシータパワーおよびデルタパワーより、覚醒、レム睡眠、ノンレム睡眠に区分し、それぞれのステージの時間を測定した。

(5) 免疫組織染色

ACMS 負荷後の行動試験が終了した後に、灌流固定を行い、海馬を含む脳の凍結切片 (30 μ m) を作製した。蛍光免疫組織染色法により、GABA 神経のマーカーである、parvalbumin (PV)、somatostatin (SST)、GABA 合成酵素である glutamate decarboxylase (GAD) を染色した。

δ オピオイド受容体作動薬による神経活性を評価するために、KNT-127 (30 mg/kg, i.p.) 投与 60 分後に灌流固定を行い、凍結切片を作製した。蛍光免疫組織染色により、神経活性化マーカーである c-Fos および GAD を染色した。

(6) ウェスタンブロット

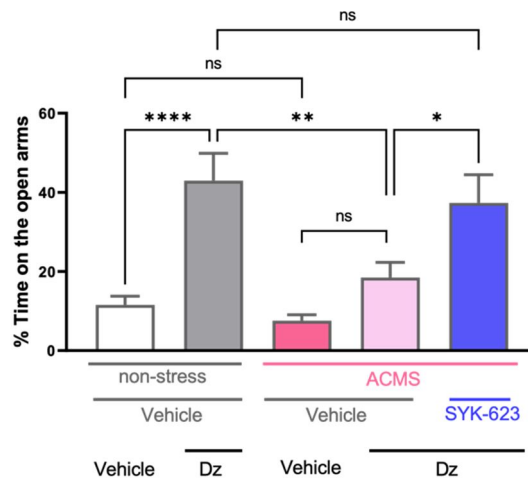
行動実験終了後の動物に麻酔をかけ、海馬を素早く摘出した。海馬のホモジナイズを SDS-PAGE で分離した後に、ウェット法により PVDF 膜に転写した。PVDF 膜を抗 GAD 抗体を用いて染色し、化学発光により検出した。

4. 研究成果

(1) SYK-623 は慢性ストレスによる行動障害を改善した。

ACMS マウスはコントロール群と比較して、尾懸垂試験における無動時間の延長とショ糖嗜好性試験におけるショ糖嗜好性の低下が生じており、うつ様行動が認められた。さらに、Y-maze 試験および modified Y-maze 試験において、空間作業記憶と空間短期記憶の低下が認められた。これらの行動障害は、SYK-623 を投与した ACMS マウスでは認められなかった。これらのことから、以前に報告した抗うつ様作用、学習記憶改善作用が再現された。また、今回新たに、ショ糖嗜好試験による無快感に関しても、SYK-623 が改善または障害の抑制を行うことが示唆された。

不安様行動を調べるために高架式十字迷路を行ったところ、ACMS マウスはコントロール群と比較して有意な不安様行動が認められなかった。さらに、コントロール群、ACMS 群いずれに対しても SYK-623 は抗不安様作用を示さなかった。しかし、抗不安薬ジアゼパムによる抗不安様作用は、ACMS モデルにおいて有意に減弱しており、この変化は SYK-623 投与により抑制された。これらのことから、SYK-623 は不安を減弱するための回路を慢性ストレスから保護することが示唆された。

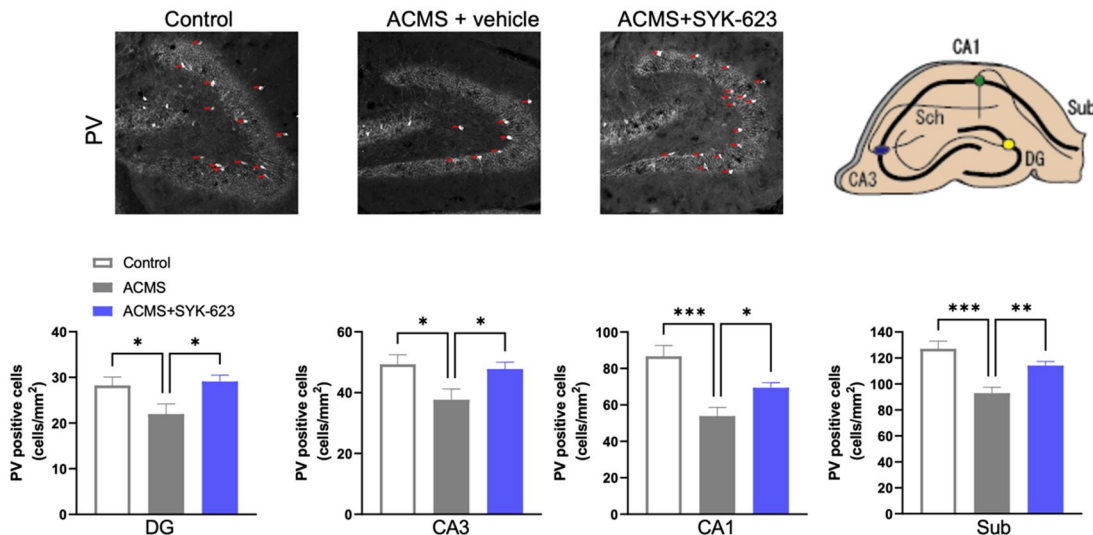


(3) SYK-623 は慢性ストレスによる睡眠異常を抑制した。

海馬の局所 LFP と EMG から睡眠の評価を行った。ACMS マウスは正常マウスと比べて覚醒時間が長い傾向が見られた。SYK-623 投与群では、このような覚醒傾向は認められなかった。一方、 δ オピオイド受容体を刺激した際の睡眠への影響を調べるために、作動薬である KNT-127 および SYK-320 を投与した。いずれの作用薬も、覚醒時間の有意な延長が認められ、 δ オピオイド受容体への刺激が睡眠を抑制することが明らかになった。 δ オピオイド受容体作動薬による覚醒作用のメカニズムを調べるために、KNT-127 投与後の神経活動の変化を c-Fos の免疫組織染色により検討した。KNT-127 は、帯状皮質、海馬において、c-Fos 発現を増加させた。さらに、覚醒に重要な領域の一つである、視床室傍核においても c-Fos の発現増加が認められた。これらのことから、 δ オピオイド受容体への刺激は、覚醒に関わる脳領域を活性化させることが示唆された。慢性ストレス負荷により、内在性のリガンドの増加や構成的な受容体活性の亢進が生じているか否かについては今後の課題である。

(4) SYK-623 は慢性ストレスによる海馬 GABA 神経の減少を抑制した。

以前の研究で、ストレス負荷後に SYK-623 が海馬の FosB を活性化させたことや、海馬が学習記憶やストレス制御に重要な役割を担っていることから、海馬が SYK-623 の標的領域である可能性が考えられる。海馬において δ オピオイド受容体は GABA 神経に多く局在することから、GABA 神経に対するストレスの影響と SYK-623 の効果について検討した。



*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 (Sidak's test, n=6-8)

ACMS マウスにおいて、PV 陽性 GABA 神経および SST 陽性 GABA 神経細胞数、GAD 陽性神経線維密度は有意に減少した。さらに、海馬のウエスタンブロットにおいて、GABA 合成酵素 GAD の産生量が減少しており、慢性ストレスは GABA 神経を障害することが示された。SYK-623 は、慢性ストレスによるこのような GABA 神経や合成酵素の減少を抑制し、GABA 神経機能を保護または改善する作用があることが明らかにされた。

(5) GABA 神経細胞死は部分的に慢性ストレスモデルの行動障害を模倣した。

以前より、GABA 神経障害がうつ病の発症に関わることが示唆されているが、慢性ストレスと同程度の GABA 神経細胞の減少が、慢性ストレスで見られるような行動障害を誘導するか否かについては明らかにされていなかった。そこで我々は、比較的低濃度の GABA 神経毒 GAT1sp を投与して軽度の GABA 神経細胞死を誘導した。腹側海馬の GABA 細胞死は、ショ糖嗜好試験における快感消失を誘導したが、認知機能に影響を及ぼさなかった。一方、背側 GABA 神経の細胞死は認知機能を低下させた。ACMS マウスでは、認知機能や快感に重要な領域である側坐核や自律神経機能の上位中枢である背側脚皮質において顕著に ERK 活性化を増加させ、この反応は SYK-623 により抑制された。ACMS 負荷と同様に、GABA 神経細胞死もこれらの領域における ERK 活性化を増加させた。以上の結果は、GABA 神経の障害が、慢性ストレスで誘導される行動変化に関与しており、SYK-623 の認知機能改善作用に GABA 神経機能の改善が関与する可能性を示唆している。

(6) 総括

以上より、本研究において慢性ストレスにより GABA 神経障害が誘導され、SYK-623 は GABA 神経を保護することで、うつ病モデルマウスにおける認知機能を正常に保つ作用があると考えられる。SYK-623 は、認知機能障害や抑うつ様行動だけでなく、睡眠障害や抗不安薬の作用減弱に対しても有効性が示された。これらの機能にも、GABA 性の抑制性伝達が深く関与することが知られている。SYK-623 は、慢性ストレスから抑制性神経伝達を保護することによって GABA が関与する様々な生理機能を正常に保つ効果を有する可能性が考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岩井孝志, 穂永 守, 中島帆乃華, 尾山実砂, 平山重人, 渡辺 俊, 藤井秀明, 田辺光男
2. 発表標題 オピオイド受容体逆作動薬SYK-623は慢性ストレスから海馬GABA神経を保護する
3. 学会等名 生体機能と創薬シンポジウム2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩井孝志, 中島帆乃華, 穂永 守, 尾山実砂, 平山重人, 渡辺 俊, 藤井秀明, 田辺光男
2. 発表標題 オピオイド受容体逆作動薬SYK-623の慢性ストレス誘発海馬GABA神経障害に対する抑制作用
3. 学会等名 第40回鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩井孝志, 渡辺理紗子, 平山重人, 尾山実砂, 渡辺 俊, 藤井秀明, 田辺光男
2. 発表標題 オピオイド受容体アゴニストKNT-127はマウスの睡眠を抑制する
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岩井孝志, 三島零, 中村謙介, 尾山実砂, 渡辺俊, 田辺光男
2. 発表標題 ACTHと慢性ストレスを併用したうつ病モデル動物の特徴に関する検討
3. 学会等名 第50回日本神経精神薬理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岩井孝志、渡辺理紗子、尾山実砂、平山重人、渡辺俊、藤井秀明、田辺光男
2. 発表標題 オピオイド受容体作動薬KNT-127の睡眠に対する影響
3. 学会等名 第52回 日本神経精神薬理学会年会 BPCNP4学会合同年会 日本生物学的精神医学会/日本臨床精神神経薬理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岩井孝志、藤田芽生、渡辺理紗子、平山重人、尾山実砂、渡辺俊、藤井秀明、田辺光男
2. 発表標題 Effects of KNT-127, a delta opioid receptor agonist, on non-REM sleep in mice.
3. 学会等名 第96回日本薬理学会
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
---------------------------	-----------------------	----

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