

令和 5 年 5 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15711

研究課題名（和文）早期抗うつ効果発現を可能とする脳内分子神経メカニズムの解明

研究課題名（英文）Mechanisms of fast-acting antidepressant actions

研究代表者

李 海燕（Li, Haiyan）

京都大学・医学研究科・特定研究員

研究者番号：90840314

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：心理・社会ストレスは、ストレス抵抗性・回復力や記憶・認知などの高次脳機能を低下させることで精神疾患の発症リスク増大につながると想定されている。一方、適度な運動は記憶形成に重要な脳海馬領域を活性化すること、低中等度のうつ病患者に対しては、運動療法が有効である可能性が示唆されている。しかし、運動トレーニングがストレスレジリエンスを獲得する脳内メカニズムはいまだに不明である。本研究課題では、申請者が独自に確立した妥当性の高いうつ病モデルマウスを用いて、独自に見出したエピジェネティック制御分子に着目することで、運動によるストレスレジリエンス獲得の分子・神経メカニズム解明をめざした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの運動と脳機能との関連研究の最大の問題点は、“現象論の記述”に留まっていることであり、運動トレーニングがストレスレジリエンスを獲得する脳内メカニズムはいまだに不明であった。本研究では、この問題点を克服するために、申請者が独自に確立した妥当性の高いうつ病モデルマウスを用いて、独自に見出したエピジェネティック制御分子に着目することで、運動トレーニングによるストレスレジリエンス獲得の分子・神経メカニズムの一端を明らかにした。得られた成果は、運動による健康維持・増進の理解につながるだけでなく、ストレス性精神疾患の予防法や治療法の開発に資する可能性が期待できる。

研究成果の概要（英文）：Psychological and social stress is assumed to increase the risk of developing mental illnesses by impairing higher brain functions such as stress resistance, recovery, memory, and cognition. On the other hand, moderate exercise has been shown to activate the hippocampal region of the brain, which is important for memory formation, and exercise therapy has been suggested to be effective for patients with mild to moderate depression. However, the brain mechanisms by which exercise training acquires stress resilience are still unclear. In this research project, the applicant aims to clarify the molecular and neural mechanisms of stress resilience acquisition by exercise by focusing on epigenetic regulatory molecules that they have independently identified using their own highly valid depression model mice.

研究分野：神経科学

キーワード：抗うつ薬 うつ病 反応性

1. 研究開始当初の背景

うつ病における治療反応性の個人差の背景として、遺伝的背景の相違による影響が考えられ、それぞれの患者で異なる遺伝子多型やバイオタイプに基づく適切な治療薬の使いわけを目指した薬理遺伝学的アプローチがある。しかし、客観的評価指標やバイオマーカーが未だ同定されていないうつ病治療において、遺伝子型を臨床で使用可能な個別化治療マーカーにすることは現段階では困難を極めることが予測される。したがって、即効性があり、より多くの患者に治療効果の期待できる抗うつ化合物の開発と抗うつ作用の基盤となる新たな脳内メカニズムの解明が求められている。

既存の抗うつ薬の作用メカニズム仮説として、セロトニンやノルアドレナリンなどのモノアミン経路、BDNF などの神経栄養因子経路、TREKs などのカリウムチャネル経路、などに対する作用が示唆されており、それら標的シグナル分子に作用する化合物の抗うつ薬としての可能性が期待されている (Nestler, 2002)。しかし、非臨床研究においていずれも動物種やマウス系統によってそれら化合物の反応性が異なる、数週間の慢性投与が必要である、既存の抗うつ薬と比べた際の優位性が担保できていないのが現状である。また、最近 FDA により承認されたエスケタミンは即効性と持続性を併せ持つ非モノアミン系の抗うつ薬として注目されているが、麻薬指定薬物であり、取扱いや依存・乱用の問題も懸念されている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、既存の抗うつ薬より治療効果の期待できる抗うつ作用因子を同定し、神経メカニズム解明することで、科学的エビデンスに基づいたうつ病治療法の確立につなげることである。具体的には、抗うつ薬に対する反応性の異なる近交系マウスを用いて、既存の抗うつ薬(三環系、四環系、SSRI, SNRI) に対して抗うつ効果を示した反応群と効果を認めない非反応群を作製する。これら反応群と非反応群のマウス脳内の神経活動レベルを計測し、神経活動量に違いの見られた脳部位において、次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子発現解析を行う。次に、得られた遺伝子発現データから、反応群に共通して発現変動した遺伝子を抽出する。抽出遺伝子の遺伝子操作マウスや薬剤投与マウスを作製し、抗うつ薬反応性、ストレス反応性、神経細胞の形態変化を解析する。さらに、これら細胞・行動レベルでの解析にとどまらず、薬理遺伝学的手法を用いることで、抗うつ薬反応群・非反応群の神経ネットワークの変容を解析する。以上のように、本研究では抗うつ薬の作用機序に関わる新たな分子神経基盤の同定を主目的とし、うつ病に対する治療戦略を革新するエビデンスを提供することを目指す。

3. 研究の方法

(1) マウス

8週齢の雄性 C57BL/6J (B6)、DBA/2(DBA)、KDM5C 過剰発現(KDM5COE)マウスを使用した。餌と水は自由摂取させ、12時間の明暗周期下で飼育した。動物使用に伴い、本学における動物実験指針及び動物実験規則等の指針に示される基準に適合することを確認し、当該委員会による使用許可を得た。

(2) 抗うつ薬投与

三環系(イミプラミン)、四環系(マプロチリン)、SSRI(セルトラリン)、SNRI(デユロキセチン)

水を溶解し(160 mg/ml)、遮光ボトルで4週間自由摂取させた。抗うつ薬溶液は2日毎に交換した。

(3) 行動評価

Social interaction test: はじめて接触するマウスと5分間同一ケージにいれ、相手マウスとの接触時間を測定した。

Sucrose preference test: 水ボトルと1.5%スクロース液の入ったボトルをマウスに提示し、4時間での飲料水を計測した。スクロース液を飲んだ割合をSucrose preference (%)として算出した。Sucrose preferenceはアンヘドニアの症状の1つとされている。

(4) 遺伝子発現解析

マウスから内側前頭前野領域を取り出し、総RNAを抽出した。HiSeq-1500を用いたRNA-seqを行った(Higuchi et al., 2016)。また、総RNAを用いた逆転写PCR反応によりcDNAを調整し、SYBR Green Master Mixを用いたリアルタイムPCR法にて目的mRNA発現量を定量解析した。内在性コントロールにはGAPDH mRNAを使用した(Uchida et al., 2011)。

(5) 慢性ストレス負荷

マウスに社会性敗北ストレス(SDS)を負荷した。テストマウスを攻撃性の高いCD1マウスと5分間同居させ(肉体的ストレス)、その後一晩、ケージ内に仕切りを置き直接接触できないようにした(心理ストレス)。これを5日間連続して行った(Funayama et al., 2022; Inaba et al., 2023)。

(6) 統計解析

2群間比較にはunpaired t-testを、3群以上の比較にはOn-way ANOVAあるいはtwo-way ANOVAを使用した。有意差が認められた場合には、Bonferroni correctionあるいはTukey's post-hoc test分析を行った。p値が0.05未満を有意と判定した。

4. 研究成果

(1) 抗うつ薬反応群と非反応群の層別化

遺伝的背景の異なる3種類の近交系マウス(C57BL/6J、BALB/c、DBA/2系統)に慢性ストレスを負荷し、うつモデルマウスを作製した。これらマウスに様々な種類の抗うつ薬を4週間投与し、強制水泳試験を行った。その結果、マウス系統ごとに抗うつ薬の反応性が異なること、飲料水で慢性的に抗うつ薬を投与した場合は約20-40%の個体で抗うつ様作用を認めた。これは、うつ病患者におけるSSRIの奏効率(単剤で4-6週間)は約30%であるという結果と同様であった。この結果から、ヒトにおける抗うつ薬の奏効率と同様のモデルマウスを確立できたと考えた。

(2) 抗うつ薬反応群と非反応群における網羅的遺伝子発現解析

抗うつ薬反応群と非反応群における内側前頭前野(mPFC)における遺伝子発現変動をRNA-seq解析により検討した。その結果、抗うつ薬反応群に特徴的な遺伝子としてCartptを同定した。Cartptは抗うつ薬反応群においてその発現が亢進しているものの、抗うつ薬非反応群においては通常水投与マウスと同程度であった。

(3) 抗うつ薬反応群において発現増加するCartptの局在解析

抗うつ薬反応群において発現が亢進するCartptの細胞種の同定を試みた。その結果、GAD1陽性の抑制性神経細胞においてその発現を認めた。

(4) Cartpt過剰発現マウスの作製と解析

抑制性神経細胞特異的にCartptを過剰発現するマウスを作製した。このマウスに心理社会的ストレスを負荷した結果、社交性低下などの行動異常を示すことなく、ストレスレジリエンスを獲

得していた。また、強制水泳試験において、抗うつ様行動を認めた。

以上の結果から、抑制性神経細胞における Cartpt の発現亢進が抗うつ行動に必須であることが示唆された。

<引用文献>

Funayama Y, Li H, Ishimori E, Kawatake-Kuno A, Inaba H, Yamagata H, Seki T, Nakagawa S, Watanabe Y, Murai T, Oishi N, Uchida S. Antidepressant Response and Stress Resilience Are Promoted by CART Peptides in GABAergic Neurons of the Anterior Cingulate Cortex. *Biol Psychiatry Glob Open Sci.* 2022 Jan 17;3(1):87-98. doi: 10.1016/j.bpsgos.2021.12.009. PMID: 36712563; PMCID: PMC9874166.

Higuchi F, Uchida S, Yamagata H, Abe-Higuchi N, Hobara T, Hara K, Kobayashi A, Shintaku T, Itoh Y, Suzuki T, Watanabe Y. Hippocampal MicroRNA-124 Enhances Chronic Stress Resilience in Mice. *J Neurosci.* 2016 Jul 6;36(27):7253-67. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0319-16.2016. PMID: 27383599; PMCID: PMC6705534.

Inaba H, Li H, Kawatake-Kuno A, Dewa KI, Nagai J, Oishi N, Murai T, Uchida S. GPCR-mediated calcium and cAMP signaling determines psychosocial stress susceptibility and resiliency. *Sci Adv.* 2023 Apr 5;9(14):eade5397. doi: 10.1126/sciadv.ade5397. Epub 2023 Apr 5. PMID: 37018397; PMCID: PMC10075968.

Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM. Neurobiology of depression. *Neuron.* 2002 Mar 28;34(1):13-25. doi: 10.1016/s0896-6273(02)00653-0. PMID: 11931738.

Sakai Y, Li H, Inaba H, Funayama Y, Ishimori E, Kawatake-Kuno A, Yamagata H, Seki T, Hobara T, Nakagawa S, Watanabe Y, Tomita S, Murai T, Uchida S. Gene-environment interactions mediate stress susceptibility and resilience through the CaMKII β /TARP - 8/AMPA pathway. *iScience.* 2021 May 2;24(5):102504. doi: 10.1016/j.isci.2021.102504. PMID: 34113835; PMCID: PMC8170005.

Uchida S, Hara K, Kobayashi A, Otsuki K, Yamagata H, Hobara T, Suzuki T, Miyata N, Watanabe Y. Epigenetic status of Gdnf in the ventral striatum determines susceptibility and adaptation to daily stressful events. *Neuron.* 2011 Jan 27;69(2):359-72. doi: 10.1016/j.neuron.2010.12.023. PMID: 21262472.

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 2件）

1. 著者名 Funayama Yuki, Li Haiyan, Ishimori Erina, Kawatake-Kuno Ayako, Inaba Hiromichi, Yamagata Hirota, Seki Tomoe, Nakagawa Shin, Watanabe Yoshifumi, Murai Toshiya, Oishi Naoya, Uchida Shusaku	4. 巻 -
2. 論文標題 Antidepressant Response and Stress Resilience Are Promoted by CART Peptides in GABAergic Neurons of the Anterior Cingulate Cortex	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biological Psychiatry Global Open Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bpsgos.2021.12.009	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 Inaba Hiromichi, Li Haiyan, Kawatake-Kuno Ayako, Dewa Ken-ichi, Nagai Jun, Oishi Naoya, Murai Toshiya, Uchida Shusaku	4. 巻 9
2. 論文標題 GPCR-mediated calcium and cAMP signaling determines psychosocial stress susceptibility and resiliency	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.ade5397	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0件

〔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
---------	---------