

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790599

 研究課題名（和文） 脳代謝型グルタミン酸 2/3 受容体の創薬的意義に関する  
神経薬理学的研究

 研究課題名（英文） Neuropharmacological study on drug development targeting for  
brain metabotropic glutamate 2/3 receptors

研究代表者

吾郷 由希夫 (AGO YUKIO)

大阪大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号：50403027

研究成果の概要（和文）：既存の抗うつ薬によるうつ病の完解率は 30～50%であり，新たな作用点をもつ治療薬の開発が望まれている．本研究では，既存の抗うつ薬に抵抗性を示す慢性的グルココルチコイド処置マウスのうつ様状態に対して，代謝型グルタミン酸 2/3 受容体拮抗薬が有効であることを見いだした．また本マウスの大脳皮質前頭前野においてドパミン神経機能の亢進が認められ，既存の抗うつ薬はこのドパミン神経活性化に影響を与えなかったが，代謝型グルタミン酸 2/3 受容体拮抗薬により改善がみられた．本研究の成績は，代謝型グルタミン酸 2/3 受容体が，治療抵抗性うつ病に対する有力な創薬標的分子であることを示唆する．

研究成果の概要（英文）：Only 30–50% of patients with depression enter remission after antidepressant treatment. Thus, discovering novel neuronal mechanisms of pathophysiology of depression as well as more effective treatments are necessary. In this study, metabotropic glutamate 2/3 receptor antagonists showed antidepressant-like effects in chronic glucocorticoid-treated mice, an animal model of conventional antidepressant-resistant depression. Chronic glucocorticoid treatment markedly increased prefrontal dopaminergic activity, and this enhanced activity was blocked by metabotropic glutamate 2/3 receptor antagonists, but not conventional antidepressants. The present findings suggest that the metabotropic glutamate 2/3 receptor is a promising target for the treatment of patients with treatment-resistant depression.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

 キーワード：うつ病，代謝型グルタミン酸 2/3 受容体 (mGlu2/3 受容体)，環境要因，  
グルココルチコイド，グリア細胞，大脳皮質前頭前野，海馬，ドパミン

## 1. 研究開始当初の背景

選択的セロトニン再取り込み阻害薬およびセロトニン／ノルアドレナリン再取り込み阻害薬といったモノアミン神経系を標的とする既存の抗うつ薬は，薬効発現までに 4～6 週間かかるといわれ，また 50%以上もの患者は寛解に至らず，治療抵抗性を示すことが問題となっている．近年，難治性うつ病患

者に対する *N*-methyl-D-aspartate (NMDA)受容体遮断薬ケタミンの有効性が報告されたことから(Zarate et al., Arch Gen Psychiatry 63: 856-864, 2006), 新規抗うつ薬開発のアプローチとしてグルタミン酸神経系が注目される．しかし，NMDA 受容体遮断薬では精神症状や依存等といった副作用の発現が認められており，抗うつ薬としての開発には至っていない．一方，大うつ病患者の大脳皮質前頭前野

において、グルーブII代謝型グルタミン酸受容体(mGlu2/3受容体)の発現が増加していることが近年明らかにされたことから(Feyissa et al., Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 34: 279-283, 2010), うつ病態にもグルタミン酸神経伝達異常, あるいは機能変化が深く関与していることが示唆される。

これまでに研究代表者らは, 幼少期に他個体との相互作用を欠如させた長期社会的隔離飼育マウスや, 生体内のストレス応答システムである視床下部-下垂体-副腎皮質系(HPA系)の過活動を人為的に引き起こしたグルココルチコイド長期負荷マウスの作製・評価から, 両マウスがうつ病の発症・形成過程における構成概念妥当性(環境要因の関与)をみたく優れたうつ病モデル動物であることを示唆してきた(Ago et al., Neuropharmacology 55: 1355-1363, 2008). そして分子イメージング解析から, 長期隔離飼育マウスの大脳皮質, 海馬においてmGlu2/3受容体の結合能が増加していること, さらにmGlu2/3受容体拮抗薬が本マウスのうつ様行動を抑制することを見いだした(Kawasaki et al., Neuropharmacology 60: 397-404, 2011). このように, 従来の正常動物を用いた検討とは異なり, ヒト病態の生物学的基盤を背景にもつような環境要因誘発モデルでの解析は, うつ病の新しい治療薬の開発, 治療戦略の構築に大きく貢献するものと考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では, 環境要因を基盤としたうつ病モデル動物, すなわち「長期隔離飼育マウス」および「グルココルチコイド長期負荷マウス」を用いて, mGlu2/3受容体拮抗薬の抗うつ様作用の分子機序とその創薬的意義を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 実験動物

長期隔離飼育マウスは, 3週齢のddY系雄性マウスを, 6週間以上周囲の見えない灰色のケージ(24 × 17 × 12 cm)において1匹で飼育することにより作製した。対照群には, 同じ大きさの透明なケージにおいて5~6匹で群飼育したのを用いた。グルココルチコイド長期負荷マウスは, 6週齢のddY系雄性マウスに3週間コルチコステロン(20 mg/kg)を1日1回皮下投与することで作製した。対照群には, 溶媒を同様に3週間投与したのを用いた。

### (2) 強制水泳試験

アクリル製シリンドラー(直径19 cm, 高さ25 cm)内に水(25 ± 1°C)を13 cmの深さまで入れ,

マウスを1匹ずつ6分間水泳させ, その様子をビデオ録画した。試験終了後, マウスを速やかに水中より引き上げ, ペーパータオルで清拭した。「手足などを動かすことなく水面に浮いているだけの状態」を無動とみなし, 試験後半4分間の無動時間を解析した。

### (3) *In vitro* オートラジオグラフィ

マウスを深麻酔下, 脳を摘出し, ドライアイスパウダーで凍結させた後, 厚さ20 μmの冠状切片を作製した。作製した脳切片を [<sup>3</sup>H]LY341495を含むbuffer中でインキュベーションし, 乾燥後トリチウム感受性イメージングプレートに3日間コンタクトした。その後, プレートをイメージングアナライザーFLA-7000 (Fujifilm)で読み取り, 放射能分布画像を得た。解析にはImage gaugeを用い, 画像強度を表す相対値であるPSL(Photo-Stimulated Luminescence)値を算出した後, 標準スケールにより定量した。

### (4) 遺伝子発現解析

脳内の各遺伝子のmRNA発現量は, リアルタイムPCR法により測定した。SV Total RNA Isolation System (Promega)を用いてRNAを抽出後, 逆転写反応を行いcDNAサンプルを作製した。GoTaq<sup>®</sup> qPCR master mix (Promega)を用い, サンプル中に含まれる標的遺伝子量をDNA Engine Opticon System (MJ Research)により計測した。データは, GAPDHを内部標準遺伝子として補正した相対値で表した。

### (5) 海馬神経新生

海馬歯状回領域における細胞増殖と新生細胞の生存能について, 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)の取り込みを指標に, 免疫組織化学的手法により解析した。

### (6) 神経伝達物質遊離測定

脳内の細胞外グルタミン酸, ドパミン遊離量は, *in vivo* マイクロダイアリス法により解析した。ペントバルビタール麻酔下, 大脳皮質前頭前野(ブregマより1.9 mm前方, 0.5 mm右側方, 頭蓋表面より深さ0.8 mm)にガイドカニューレを挿入固定した。測定時に透析プローブを挿入し, リンゲル液を流速2.0 μL/minで灌流した。サンプルは10分単位で回収し, 直ちに高速液体クロマトグラフィー/電気化学検出器システムに連続自動インジェクションし測定した。

## 4. 研究成果

### (1) うつ様行動に対する既存の抗うつ薬, mGlu2/3受容体拮抗薬の作用

先ず, 長期隔離飼育マウス, グルココルチコイド長期負荷マウスのうつ様行動に対す

る三環系抗うつ薬デシプラミンと選択的セロトニン再取り込阻害薬フルオキセチンの作用について検討し、既存の抗うつ薬に対する反応性を確認した。その結果、長期隔離飼育マウスにおいては、対照群である群飼育マウスと同様、両薬物の急性投与により強制水泳試験での無動時間の短縮がみられ、抗うつ様作用が認められた。一方で、グルココルチコイド長期負荷マウスにおいては、デシプラミンならびにフルオキセチンの急性投与による影響はみられず、またデシプラミンを2週間慢性投与した条件下においても、無動時間の短縮はみられなかった。研究代表者らは以前の研究から、コルチコステロン慢性投与マウスでは、HPA系のフィードバック機能において重要な役割を担っている大脳皮質前頭前野グルココルチコイド受容体の発現が低下していること、強制水泳ストレスに対するHPA系の応答性が消失していることを明らかにしている (Ago et al., *Neuropharmacology* 55: 1355-1363, 2008)。臨床研究において、治療抵抗性うつ病態にHPA系の異常が関与しているとの報告がなされていることから、グルココルチコイド長期負荷マウスは、既存のモノアミン神経系抗うつ薬に抵抗性を示す難治性のうつ病モデルであることが示唆された。このような条件下、mGlu2/3受容体拮抗薬である MGS0039 と LY341495 は急性投与において、長期隔離飼育マウスのみならず、グルココルチコイド長期負荷マウスのうつ様行動も抑制し、両モデルにおいて抗うつ様作用を示した。本成績から、mGlu2/3受容体拮抗薬がHPA系機能異常をともなう治療抵抗性うつ病に対して有効な治療薬となる可能性が示された。

### (2) うつ病モデルの脳内神経栄養因子／成長因子の発現、海馬神経新生

抗うつ薬は急性投与で細胞外アミン神経伝達物質の量を増加させるが、臨床効果の発現には慢性投与が必要である。この脳内アミン量増加と臨床効果発現のタイムラグは、抗うつ作用の発現機構に神経系の適応現象が関わっていることを示唆する。このような背景において、海馬の神経可塑性の基盤である神経栄養因子、神経新生がうつ病の病態の分子基盤として、また抗うつ薬の作用機構として注目されている。そこで、グルココルチコイド長期負荷マウス脳での神経栄養因子／成長因子の発現、海馬神経新生について検討した。グルココルチコイド長期負荷マウスの海馬歯状回において、細胞増殖能と新生細胞の生存能の低下がみられ、神経新生の低下が認められた。さらに、グルココルチコイド長期負荷マウスの海馬および大脳皮質において、血管内皮増殖因子(VEGF)の蛋白質発現が低下していた。一方、脳由来神経栄養因子

(BDNF)、インスリン様成長因子1(IGF-1)の発現量に影響はみられなかった。この海馬VEGF発現の低下は、長期隔離飼育マウスにおいても認められた。デシプラミンの慢性投与は、正常マウスの海馬VEGF発現量を増加させたが、グルココルチコイド長期負荷マウスの海馬VEGF発現量の低下は改善しなかった。これらの成績は、環境要因誘発モデルのうつ様行動の発現に、VEGFを介するシグナルの変化が関与する可能性を示すものと考えられるが、本研究期間内においては、mGlu2/3受容体拮抗薬の作用を確認するに至らなかった。

### (3) うつ病モデルの脳内グルタミン酸神経機能評価

以前の研究から、長期隔離飼育マウスの大脳皮質、海馬においてmGlu2/3受容体の結合能が増加していることを見だし、本マウスの病態におけるグルタミン酸神経系変化の関与を示唆した (Kawasaki et al., *Neuropharmacology* 60: 397-404, 2011)。そこで、既存の抗うつ薬に抵抗性を示すグルココルチコイド長期負荷マウスに関して、脳内グルタミン酸神経機能評価を行った。しかしながら、*in vitro* オートラジオグラフィからは、グルココルチコイド長期負荷マウスのいずれの脳領域においてもmGlu2/3受容体結合能に変化は認められなかった。

mGlu2受容体は神経終末のプレおよびポストシナプス部に存在している一方で、mGlu3受容体はグリア細胞に高発現していることから、グリア細胞の生存や機能調節、グルタミン酸代謝に関わる分子の発現変化について検討を行った。その結果、グルココルチコイド長期負荷マウスの海馬において、グリア型グルタミン酸トランスポーターであるGLT-1とGLASTのmRNA発現の低下、大脳皮質においてはGLAST mRNAの発現低下がみられた。本成績から、グルココルチコイド長期負荷マウス脳では、グリア細胞によるグルタミン酸取り込み能が低下し、細胞外の神経終末周囲にグルタミン酸がspilloverしている可能性が考えられた。しかしながら、*in vivo* マイクロダイアリス法からは、本マウスの大脳皮質グルタミン酸遊離に影響はみられなかった。さらに、グルココルチコイド長期負荷マウスに対するmGlu2/3受容体拮抗薬の抗うつ様作用は、神経終末のポストシナプス部に豊富に存在するAMPA型グルタミン酸受容体の拮抗薬では抑制されなかった。以上の結果から、グルココルチコイド長期負荷マウスでは、グリア細胞でのグルタミン酸制御機能に一部影響がみられている可能性はあるものの、mGlu2/3受容体拮抗薬の抗うつ様作用機序には、グルタミン酸神経機能調節以外のメカニズムの関与が示唆された。

#### (4) うつ病モデルのモノアミン神経機能と mGlu2/3 受容体拮抗薬の作用

これまでに、ストレス負荷やグルココルチコイド処置が大脳皮質ドーパミン神経を活性化すること、グルココルチコイドの慢性投与により大脳皮質へ投射するドーパミン神経の起始核である腹側被蓋野においてドーパミン合成酵素であるチロシン水酸化酵素量が増加することが報告されている。研究代表者らは、グルココルチコイド長期負荷マウスの大脳皮質前頭前野において、脱分極刺激によるドーパミン遊離応答性が増強していることを明らかにしている (Ago et al., *Neuropharmacology* 55: 1355-1363, 2008)。そこで、このドーパミン神経活性の亢進に対する既存の抗うつ薬、mGlu2/3 受容体拮抗薬の作用について検討した。その結果、mGlu2/3 受容体拮抗薬は、グルココルチコイド長期負荷マウスにおいて認められる大脳皮質ドーパミン遊離上昇の増強を、抗うつ様作用を示す用量において有意に抑制した。一方、本マウスに対して抗うつ様作用を示さなかったデシプラミンやフルオキセチンでは、抑制作用は認められなかった。以上の結果から、グルココルチコイド長期負荷マウスのうつ様行動発現に大脳皮質ドーパミン神経機能の亢進が関与すること、また mGlu2/3 受容体拮抗薬は、大脳皮質ドーパミン神経活性化を抑制することにより、本モデルマウスのうつ様行動を改善する可能性が示された。

#### 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 5 件)

① Shigeyuki Chaki, Yukio Ago, Agnieszka Palucha-Paniewiera, Francesco Matrisciano, Andrzej Pilc. mGlu2/3 and mGlu5 receptors: Potential targets for novel antidepressants. *Neuropharmacology*, vol. 66, p. 40-52, 2013. 査読有.  
doi: 10.1016/j.neuropharm.2012.05.022.

② Yukio Ago, Koji Yano, Ryota Araki, Naoki Hiramatsu, Yuki Kita, Toshiyuki Kawasaki, Hirotaka Onoe, Shigeyuki Chaki, Atsuro Nakazato, Hitoshi Hashimoto, Akemichi Baba, Kazuhiro Takuma, Toshio Matsuda. Metabotropic glutamate 2/3 receptor antagonists improve behavioral and prefrontal dopaminergic alterations in the chronic corticosterone-induced depression model in mice. *Neuropharmacology*, vol. 65, p. 29-38, 2013. 査読有.  
doi: 10.1016/j.neuropharm.2012.09.008.

③ Yukio Ago, Naoki Hiramatsu, Toshihiro Ishihama, Keisuke Hazama, Atsuko Hayata-Takano, Yasuhiro Shibasaki, Norihito Shintani, Hitoshi Hashimoto, Toshiyuki Kawasaki, Hirotaka Onoe, Shigeyuki Chaki, Atsuro Nakazato, Akemichi Baba, Kazuhiro Takuma, Toshio Matsuda. The selective metabotropic glutamate 2/3 receptor agonist MGS0028 reverses psychomotor abnormalities and recognition memory deficits in mice lacking the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Behavioural Pharmacology*, vol. 24, p. 74-77, 2013. 査読有.  
doi: 10.1097/FBP.0b013e32835cf3e5.

④ Yukio Ago, Ryota Araki, Koji Yano, Toshiyuki Kawasaki, Shigeyuki Chaki, Atsuro Nakazato, Hirotaka Onoe, Hitoshi Hashimoto, Akemichi Baba, Kazuhiro Takuma, Toshio Matsuda. The selective metabotropic glutamate 2/3 receptor agonist MGS0028 reverses isolation rearing-induced abnormal behaviors in mice. *Journal of Pharmacological Sciences*, vol. 118, p. 295-298, 2012. 査読有.  
doi: 10.1254/jphs.11200SC.

⑤ Yukio Ago, Ryota Araki, Koji Yano, Naoki Hiramatsu, Toshiyuki Kawasaki, Shigeyuki Chaki, Atsuro Nakazato, Hirotaka Onoe, Hitoshi Hashimoto, Akemichi Baba, Kazuhiro Takuma, Toshio Matsuda. Activation of metabotropic glutamate 2/3 receptors attenuates methamphetamine-induced hyperlocomotion and increase in prefrontal serotonergic neurotransmission. *Psychopharmacology (Berl)*, vol. 217, p. 443-452, 2011. 査読有.  
doi: 10.1007/s00213-011-2295-3.

[学会発表] (計 15 件)

① 荒木良太, 吾郷 由希夫, 笹賀 あすか, 西山 早紀, 田熊 一敬, 松田 敏夫. 長期隔離飼育マウスのマウス間相互作用応答性異常の神経化学的基盤. 日本薬学会第 133 年会, 2013 年 3 月 27-30 日, 横浜.

② 荒木 良太, 吾郷 由希夫, 笹賀 あすか, 西山 早紀, 田熊 一敬, 松田 敏夫. 精神的マウス間相互作用による長期隔離飼育マウスの前頭前野セロトニン神経活性化. 第 86 回日本薬理学会年会, 2013 年 3 月 21-23 日, 福岡.

③ Yukio Ago, Koji Yano, Ryota Araki, Naoki Hiramatsu, Kazuhiro Takuma, Toshio Matsuda. Antidepressant-like effect of LY341495, a

metabotropic glutamate 2/3 receptor antagonist, in the chronic corticosterone-treated mice, an animal model of treatment-resistant depression. The 42nd annual meeting of the Society for Neuroscience (Neuroscience 2012), 13-17 October, 2012, New Orleans (USA).

④ 荒木 良太, 吾郷 由希夫, 笹賀 あすか, 田熊 一徹, 松田 敏夫. 社会的相互作用ストレスによる長期隔離飼育マウス前頭前野のモノアミン遊離と神経活性化. 第 35 回日本神経科学大会, 2012 年 9 月 18-21 日, 名古屋.

⑤ 荒木 良太, 吾郷 由希夫, 笹賀 あすか, 西山 早紀, 田熊 一徹, 松田 敏夫. 長期隔離飼育マウスの神経科学的コミュニケーション異常. 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2012, 2012 年 9 月 1 日, 神戸.

⑥ 笹賀 あすか, 荒木 良太, 吾郷 由希夫, 田熊 一徹, 松田 敏夫. 長期隔離飼育マウスの異常行動発現における AMPA 受容体の関与. 生体機能と創薬シンポジウム 2012, 2012 年 8 月 30-31 日, 神戸.

⑦ 吾郷 由希夫, 荒木 良太, 橋本 均, 田熊 一徹, 松田 敏夫. 代謝型グルタミン酸 2/3 受容体作動薬による精神疾患病態モデルマウス異常行動の改善とその神経化学的基盤. 第 9 回 GPCR 研究会, 2012 年 5 月 11-12 日, 東京.

⑧ 矢野 耕史, 吾郷 由希夫, 荒木 良太, 平松 直樹, 田熊 一徹, 松田 敏夫. コルチコステロン慢性投与マウスのうつ様行動と大脳皮質ドパミン神経機能に対する代謝型グルタミン酸 2/3 受容体アンタゴニストの作用. 日本薬学会第 132 年会, 2012 年 3 月 28-31 日, 札幌.

⑨ Ryota Araki, Asuka Sasaga, Yukio Ago, Kazuhiro Takuma, Toshio Matsuda. Involvement of prefrontal AMPA receptors in aggressive behavior and cognitive impairment of social isolation-reared mice. The 41st annual meeting of the Society for Neuroscience (Neuroscience 2011), 12-16 November, 2011, Washington DC (USA).

⑩ 矢野 耕史, 吾郷 由希夫, 荒木 良太, 平松 直樹, 田熊 一徹, 松田 敏夫. グルココルチコイド長期負荷マウスにおける代謝型グルタミン酸 2/3 受容体拮抗薬の抗うつ様作用と前頭葉ドパミン神経機能の関与. 第 21 回日本臨床精神神経薬理学会・第 41 回日本神経精神薬理学会 合同年会, 2011 年 10 月 27-29 日, 東京.

⑪ Yukio Ago, Shigeyuki Chaki, Kazuhiro Takuma, Toshio Matsuda. Antidepressant-like effect of a metabotropic glutamate 2/3 receptor antagonist. 7th International Meeting on Metabotropic Glutamate Receptors, 2-7 October, 2011, Taormina (Italy).

⑫ 荒木 良太, 吾郷 由希夫, 笹賀 あすか, 田熊 一徹, 松田 敏夫. マウス間相互作用による長期隔離飼育マウス前頭前野の活性化とドパミン、セロトニン遊離の促進. 第 54 回日本神経化学学会大会, 2011 年 9 月 26-28 日, 加賀.

⑬ 吾郷 由希夫, 田熊 一徹, 松田 敏夫. 環境因子/ストレスホルモンによるうつ様行動の発現と代謝型グルタミン酸 2/3 受容体. 第 54 回日本神経化学学会大会, 2011 年 9 月 26-28 日, 加賀.

⑭ Yukio Ago, Toshiyuki Kawasaki, Hiroataka Onoe, Kazuhiro Takuma, Toshio Matsuda. Role of brain metabotropic glutamate 2/3 receptors in social isolation-induced depressive behavior of mice. 2nd congress of Asian College of Neuropsychopharmacology (AsCNP), 23-24 September, 2011, Seoul (Korea).

⑮ 矢野 耕史, 吾郷 由希夫, 荒木 良太, 平松 直樹, 田熊 一徹, 松田 敏夫. コルチコステロン慢性投与マウスでの代謝型グルタミン酸 2/3 受容体アンタゴニストの抗うつ様作用と前頭葉ドパミン神経系. 第 119 回日本薬理学会近畿部会, 2011 年 7 月 8 日, 名古屋.

[その他]  
ホームページ等  
<http://www.phs.osaka-u.ac.jp/homepage/b013/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

吾郷 由希夫 (AGO YUKIO)  
大阪大学・大学院薬学研究科・助教  
研究者番号：50403027