

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460221

研究課題名(和文)体内時計システムを利用した新規抗うつ薬創薬ターゲットの探索

研究課題名(英文)Development for new targets of anti-depressants using biological clock-system

研究代表者

牛島 健太郎(Ushijima, Kentaro)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：70448843

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：臨床うつ病の誘発が報告されているインターフェロン- $\alpha$ 、メフロキン、トピラマートをマウスに投与し強制水泳試験を行った。インターフェロンはマウスの無動時間を有意延長させた一方、メフロキンおよびトピラマートは無動時間を有意に短縮させた。つまり、本研究で使用した薬物による行動学的変容は異なる結果であった。続いて、これらの薬物を投与したマウスの脳内時計遺伝子の発現パターンを測定した。いずれの薬物を投与した場合でも、海馬内Per3 mRNA発現量が有意に低下し、発現リズム振幅が減弱することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In this study, forced swimming test was performed in mice administered with interferon-alpha, mefloquine, and topiramate which are reported to induce a depressive disorder in clinical situation. Interferon-alpha significantly increased the immobility-time of mice, while mefloquine, and topiramate significantly decreased the time. Behavioral alterations in the forced swimming test were different by drugs used in the present study. Next, expression patterns of clock genes in the brain of mice administered with these drugs. All drugs decreased Per3 mRNA expression levels in the hippocampus, which resulted in the dampening of rhythm amplitude in mRNA expression.

研究分野：医歯薬学

キーワード：うつ病 生体リズム 時計遺伝子 薬物有害反応

## 1. 研究開始当初の背景

わが国における精神疾患の生涯罹患率は10%を越えており、急増する精神疾患への対策として病態生理の解明や効果的な薬物療法の開発が急務である。しかし、現在のモノアミン再取り込み阻害作用を有する抗うつ薬を用いた薬物療法の寛解率は高くない。さらに、うつ病様のモデル動物を用いた基礎研究は世界中で展開されているにも関わらず、うつ病治療は未だ発展途上にあると言われている。これらの問題点を克服するためには、うつ病の病因となるメカニズムをできるだけ正確に反映したモデル動物を利用して、治療薬の創薬ターゲットを探索することが重要である。

うつ病患者では、体温やホルモン分泌などの日内リズムが破綻していることは古くから指摘されており、生体リズム障害はうつ病の1つの症状であると考えられてきた。しかし近年の時間生物学研究により、“体内時計”は精神疾患の発症に關与することを示唆する知見が蓄積されている。これまでに我々は、うつ病発症と関連のあるセロトニントランスポーターの発現が体内時計に制御されることを見出し、体内時計異常がうつ病治療における新たなターゲットになるものと考えている。

慢性的ストレスを実験動物に負荷すると時計遺伝子の発現パターンが変化し、行動や体温の日内リズムが破綻することが知られている。このようにストレス負荷によるモデル動物は精神神経疾患の病態解明のためには必要不可欠であるが、実験環境や実験者などの要因が実験結果にバイアスを与えることがある。再現性のある成果を得るための工夫として、臨床うつ病の発症が問題となる薬物を実験動物に投与するアプローチを立案した。

## 2. 研究の目的

本研究では、うつ病の発症が報告されている薬物を実験動物に投与し、まず薬物による行動学的変容が同一であるか否か明らかにする。続いて、これらの薬物を実験動物に投与することにより体内時計に乱れが生じるか否か明らかとし、その乱れた体内時計を主軸として発現が変動する遺伝子を網羅的に探索する。

体内時計は20種類の時計遺伝子から成る転写調節システムであり、時計遺伝子の発現は一日の中でリズムカルに変化する。したがって、時計遺伝子発現の変化は発現量の増減だけでなくリズム振幅やリズム位相も評価する。また、体内時計システムは視交叉上核(親時計)だけでなく生体のあらゆる臓器や細胞において機能しており、視交叉上核と他の脳部位では発現のリズム位相が異なる。近年、記憶や認知機能に關与する部位である海

馬がうつ病発症に重要とされており、うつ病患者では海馬体積が縮小し、海馬機能の低下が示唆されている。そこで本研究では、視交叉上核に加えて海馬や前脳基底(睡眠覚醒を実行する部位)などの部位も採取して検討を行う。複数の薬物において共通して変動する時計遺伝子やその被支配分子を抽出し、その分子が新規抗うつ薬のターゲットになる可能性について評価していく。

## 3. 研究の方法

### 【実験動物】

実験には C57BL/6 雄性マウスを使用した。自由摂食飲水、明期を 07:00-19:00 とする 12 時間明暗周期、恒温恒湿(温度;  $24 \pm 1$  , 相対湿度;  $60 \pm 70\%$ ) の条件下で 1 週間以上飼育した後、実験に使用した。暗期における実験では、動物への光刺激を最小限とするために赤色灯を用いて行った。

### 【使用薬物および投与方法】

インターフェロン- $\alpha$ : 浸透圧ミニポンプを使用して、0.5 kU/hr または 3.0 kU/hr の速度で 7 日間連日投薬した。

メフロキン: コーン油を溶媒とし、60 mg/kg または 180 mg/kg を 3 日間連日経口投与した。投与開始から 7 日目において実験に供した。

トピラマート: 20%ジメチルホルムアミドを溶媒とし、浸透圧ミニポンプを使用して 6  $\mu\text{g/hr}$  または 36  $\mu\text{g/hr}$  の速度で 7 日間連日投薬した。

### 【強制水泳試験】

水槽(高さ; 25 cm, 内径; 10 cm) に水位 10 cm まで水を満たし(水温; 21-23 ), その中にマウスを 5 分間投入した。マウスが水面上に頭を出し全く動かなくなった状態、もしくはその状態を維持するために認められる微動を無動状態と定義し、マウスの無動時間を 5 分間測定した。

### 【時計遺伝子発現測定】

前述の薬物を投与開始後 7 日目において、9:00, 13:00, 17:00, 21:00, 1:00, および 5:00 の 6 時点においてマウス脳を摘出した。摘出した脳組織から直ちに視交叉上核、海馬および前頭葉皮質を分画した。それぞれの脳部位から総 RNA を抽出した後、cDNA を合成し、各時計遺伝子 (Per1, Per2, Per3, Bmal1, Clock, Cry1, NPAS2, Rev-erba, および ROR $\alpha$ ) の発現量を、Real-time PCR 法を用いて測定した。

## 4. 研究成果

各薬物を用いて強制水泳試験を行った結

果を図1に示した。インターフェロン- $\alpha$ は用量依存的にマウスの無動時間を増加させ、3.0 kU/hr 群の無動時間は対照群よりも有意に大であった ( $p < 0.01$ )。一方、メフロキンおよびトピラマートは反対に、用量依存的にマウスの無動時間を短縮させた。メフロキン 180 mg/kg 群およびトピラマート 36  $\mu$ g/hr 群の無動時間は、対照マウスと比較して有意に小であった (それぞれ  $p < 0.05$  および  $p < 0.01$ )。

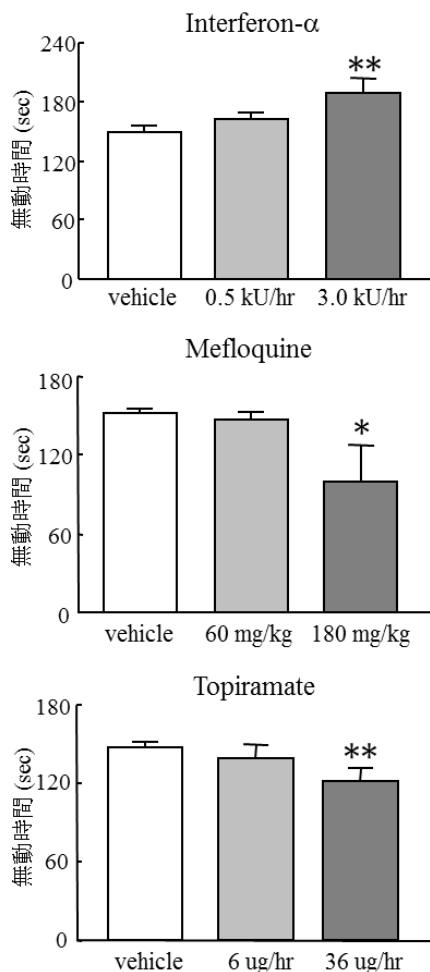


図1. 強制水泳試験におけるマウスの無動時間

n=3-4, mean  $\pm$  SE,  
\* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  vs. vehicle

一般的に、モノアミン再取り込み阻害薬を投与したマウスでは強制水泳法における無動時間が短くなることから、本試験は抗うつ薬のスクリーニングとして汎用されている。最近では、実験モデル動物における抑うつ症状の評価方法としても使用されている。しかし、強制水泳試験における実験動物の“無動”が、うつ病患者の病態や症状を適切に反映するものであるのかについては議論が分かっている。本研究においても、臨床うつ病の誘発が報告されている3種類の薬物を使用した結果、無動時間に及ぼす影響は同一ではなかつた。

したがって、行動薬理試験として強制水泳法を使用する場合、ヒトとマウスの間に種差が存在するために、薬物の影響を正確に評価することは困難であると考えられる。

続いて、体内時計中枢である視交叉上核における時計遺伝子発現リズムを測定した。本検討では、前述の強制水泳試験で用いた薬物量のうち高用量を使用した。インターフェロン- $\alpha$ を投与したマウスでは対照マウスと比較して、明期における Per1 および Rev-erba mRNA の発現量が増加した。また、インターフェロン- $\alpha$ を投与すると、NPAS2 mRNA 発現リズムの位相が12時間前進し、明期に発現のピークを認めた。しかし、その発現量は対照群との間に著明な差は認めなかった。他の測定した時計遺伝子 mRNA の発現リズムや発現量には、インターフェロン- $\alpha$ による著明な影響は認めなかった。以上より、視交叉上核内の時計機構に及ぼすインターフェロン- $\alpha$ の影響は小さいものと考えられた。

そこで、体内時計中枢以外の部位でうつ病発症との関わりが指摘されている前頭葉皮質および海馬における時計遺伝子の発現量を測定した結果、海馬において興味深い結果が得られた。インターフェロン- $\alpha$ を投与したマウスでは対照マウスと比較して、Per3 および ROR $\alpha$  mRNA の発現量が有意に低下しその発現のリズム振幅が減少した。しかし、他の時計遺伝子の発現にインターフェロン- $\alpha$ は著明な影響を与えなかった。メフロキンおよびトピラマートを用いて、同様に各脳部位における時計遺伝子 mRNA 発現リズムを測定した結果、いずれの薬物を投与してもマウス海馬内の Per3 mRNA 発現量は低下し、発現のリズム振幅が減弱することが明らかとなった。

本研究において、うつ病の誘発が報告されている3種類の薬物を用いたところ、強制水泳試験による行動薬理的検討では異なる作用が検出された。しかし、脳内の遺伝子発現に及ぼすこれら3種類の薬物の影響は類似しており、いずれの薬物も海馬内 Per3 遺伝子の発現パターンを変化させた。Per3 遺伝子を欠損させても体内時計機構に与える影響は小さいと言われている。本研究で使用した3種類の薬物を投与すると、マウスの自発運動量はわずかに低下したが、行動リズムパターンに変化は認められなかった。したがって、これらの薬物が投与されたマウスにおいて、体内時計機構自体の障害は惹起されていないと推測される。

体内時計機構のコアループは E-box を介したリズムカルな転写調節システムであり、Bmal1 および Clock による転写活性化および Per1/2 や Cry による転写抑制がその中核を担っている。本研究の成績から着目される Per3 も、Per1/2 および Cry と同様に E-box を介した転写活性を抑制することが明らかとな

っている。したがって、臨床上うつ病を誘発することが報告されているインターフェロン- $\alpha$ 、メフロキンおよびトピラマートは、マウスの体内時計機構に著明な影響を与えなかったが、海馬内 Per3 遺伝子の発現リズムを減弱させることにより、細胞内の遺伝子発現調節を変容させている可能性がある。今後、海馬内 Per3 遺伝子の転写調節機構に及ぼす薬物の影響を分子レベルで解明すること、さらに Per3 遺伝子の発現リズム平坦化による細胞内ネットワークへの影響を解明する必要がある。これらを究明することにより、うつ病治療における新たな創薬ターゲットの発見に努めていく。

(2)研究分担者 ( )  
研究者番号：  
(3)連携研究者 ( )  
研究者番号：

#### 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 1 件)

1. Ushijima K, Maekawa T, Ishikawa-Kobayashi E, Ando H, Shiga T, Fujimura A.: Influence of beta-blockers on the myocardial mRNA expressions of circadian clock- and metabolism-related genes. *J Am Soc Hypertens* 7(2): 107-117, 2013

〔学会発表〕(計 1 件)

1. 牛島健太郎、安藤仁、藤村昭夫：「生物時計を基盤にした基礎・臨床橋渡し研究 (TR, rTR)」 第 20 回日本時間生物学会学術大会シンポジウム、2013 年 11 月 9 日・10 日、大阪

〔図書〕(計 1 件)

1. 藤村昭夫、藤秀人、安藤仁、牛島健太郎：「時間治療学 - 投薬のタイミングと効果 - 」日本医事新報社、pp126-134、2013

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

(ラジオ放送)

牛島健太郎：時間治療(2)「不眠・うつ病」薬学の時間。ラジオ NIKKEI (2014 年 4 月 3 日)

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

牛島 健太郎 (Ushijima Kentaro)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：70448843