

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861006

研究課題名(和文) ストレスがIL-1 を放出させる機序の解明：うつ病治療の新たなターゲットを探して

研究課題名(英文) Psychological stress activates the inflammasome via release of ATP and stimulation of the P2X7 receptor

研究代表者

岩田 正明 (Iwata, Masaaki)

鳥取大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：40346367

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：ストレスはうつ病発症の重要なリスク因子であり、動物においてストレスは脳神経を萎縮させ、神経新生を抑制することでうつ状態を誘発することが知られる。我々は(i) ストレスが脳内で過剰なグルタミン酸を放出させること、また(ii) それに引き続くATPの誘導を介して(iii) NLRP3が活性化されることで炎症性サイトカイン(interleukin-1等)が脳内で産生され(脳内炎症)、(iv) 神経新生の抑制を生じる結果(v) うつ状態を引き起こす、ことを明らかにした。これらの治験から、ATP-P2X7-NLRP3を介した経路がうつ病治療の新たなターゲットになる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：The mechanisms underlying stress-induced inflammation that contribute to major depression are unknown. Here we show that stress increases extracellular ATP in the hippocampus and increases the inflammatory cytokine interleukin-1 (IL-1) in the hippocampus via the purinergic type 2X7 receptor (P2X7R) and the innate immune complex NLRP3 inflammasome (nucleotide-binding, leucine-rich repeat, pyrin domain containing 3). We show that administration of a P2X7R antagonist completely blocks the release of IL-1, as well as another stress-induced cytokine, tumor necrosis factor α , and the cellular and behavioral deficits caused by stress. Moreover, we show that stress activates the NLRP3 inflammasome, while NLRP3 deletion null mutant mice are resistant to developing depressive behaviors caused by chronic stress. These findings indicate that the ATP-P2X7R NLRP3 inflammasome pathway provides novel therapeutic targets for the treatment of stress-related mood disorders.

研究分野：うつ病の生物学的研究

キーワード：うつ病 ストレス 炎症 NLRP3 インフラマソーム IL-1

1. 研究開始当初の背景

(1) うつ病はがんに次いで社会的損失をもたらす重大な「国民病」と認識されつつある。2013年、厚生労働省は精神疾患を5大疾病の一つと位置づけ、国の医療対策において特に重点を置く方針を示した。中でもストレス社会におけるうつ病患者数の増加と自殺の問題は、大きな社会問題として注目されている。しかし、モノアミン再取り込み阻害薬を中心とする薬物治療では約3割に改善が認められず、従来の薬理作用に依存しない新たな作用機序に基づく創薬が喫緊の課題である。

(2) 従来薬と全く視点の異なるうつ病治療薬の開発：抗うつ薬はモノアミン再取り込み阻害作用を主効果とした薬剤から50年以上脱却できない状況が続いている。その間、社会構造は複雑化し、過度なストレス社会となり、うつ病患者数は増加の一途をたどっている。ここに新たな作用機序をもつ抗うつ薬、特にストレスに起因したうつ病を治療・予防する薬剤を社会に提供することができれば、従来薬で効果を認めない患者を救うことができる可能性がある上に、社会的に大きな損失をもたらす国民病に対し社会・経済的に貢献しうる可能性を持つ。

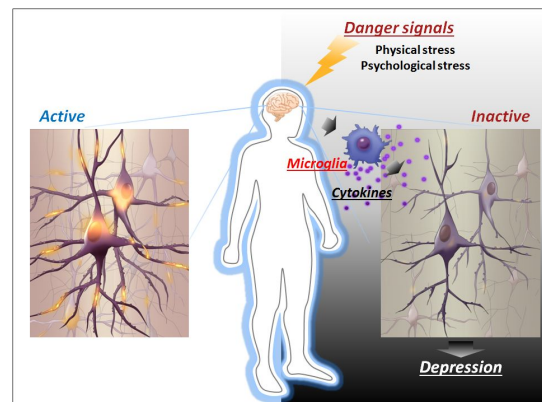
(3) 現在SSRI、SNRIなどシナプス間隙のニューロトランスミッターを増加させる薬物治療が主流となっているが、より疾患の原因に基づいた薬物開発を行うことが重要であると考えられる。ストレス-ATP-炎症系の制御により、うつ病の新たな治療法の開発、またこの現代ストレス社会におけるうつ病予防につながることを期待する。

2. 研究の目的

(1) うつ病患者では脳に萎縮が認められ、細胞レベルではニューロンのスパイン密度の低下、神経伝達物質の枯渇などが認められることから、これまでシナプスにおける神経

伝達物質の増加を目的とした薬物が開発されてきた。また近年ではケタミンやその受容体である NR2B をターゲットとした、急速に神経成長を促す薬剤の開発が行われ、これまでの課題であった抗うつ効果発現までの期間の短縮が期待されている。一方で、ストレスがなぜこのような神経の萎縮をもたらすのかは全く明らかにされていない。

(2) うつ病患者の血中でインターロイキン 1 β (IL-1 β)、IL-6 および Tumor Necrosis Factor (TNF α) などの炎症促進性サイトカインが高値であること、また慢性炎症性疾患である糖尿病やリウマチがうつ病を併発しやすいことから、炎症がうつ病と何らかの関係を持つことは以前から指摘されていた。これまで我々は IL-1 β が脳海馬神経の新生を低下させ、またうつ病様行動を誘発することを明らかにしてきた。またストレスが IL-1 β の産生・放出をどのように制御しているのか、また IL-1 β の放出を抑制することでうつ病様の行動を改善・予防することができるのか検討してきた。その結果、ストレスは脳内で ATP を放出させ、これがマイクログリア上の ATP 受容体 (P2X7 受容体) で捕らえられ、NLRP3 インフラマソームと呼ばれる細胞内受容体の働きを介して IL-1 β を成熟・放出させることが明らかになった。また我々は米国 Lundbeck 社と共同で P2X7 受容体阻害薬の抗うつ効果を立証し、今後の市場への投入、患者への利益還元が期待されている。



(3) しかし ATP がどこから、どのように放出されるのかそのメカニズムは解明されていない。また現時点では P2X7 受容体阻害剤の脳内移行率は 20%に満たず、末梢での P2X7 受容体の阻害作用は易感染性などの副作用をもたらす危険性があるため、その上流の ATP、あるいは下流の NLRP3 の制御が今後の治療ターゲットになる大きな可能性を秘めている。そこで本研究では、ストレスが ATP を放出する機序の解明と、ATP の放出制御、あるいは NLRP3 の制御がうつ病治療のターゲットとなりうるか検討した。

3. 研究の方法

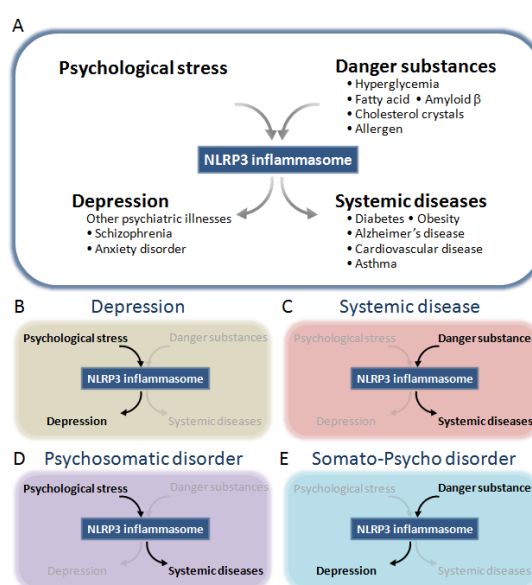
(1) ATP はあらゆる細胞に存在するが、その中でもアストロサイトを本研究のターゲットとする。背景に、これまで我々が得た予備的な知見として、ストレスがグルタミン酸を急速に増加させることにある。グルタミン酸はアストロサイトに取り込まれグルタミンに変換されニューロンに還元されること、またアストロサイトは ATP を細胞間情報伝達に用いることより ATP の放出源として最も注目している。そこでアストロサイトの初代培養細胞を用いて、グルタミン酸の投与により ATP が放出されるか検討した。

(2) グルタミン酸がその後の ATP、IL-1 β の放出やうつ病様の行動変化に関与していることが予想されたため、グルタミン酸の放出抑制剤であるリルゾールを投与した際の生体変化を検討した。ストレスによる生体反応の簡便な指標として、ストレス応答ホルモンであるコルチゾールを用いて測定した。

(3) IL-1 β の産生に直接関与しているのは NLRP3 インフラマソームであること、また P2X7 受容体の作用は NLRP3 インフラマソームを介していることから NLRP3 インフラマソームがより中心的な役割を果たしている可能性が考えられる。また興味深いことに、NLRP3 インフラマソームは細胞内外の病原

体関連分子のみならず傷害関連分子も感知することが知られている。これまで我々は、細胞内パターン認識受容体である NLRP3 が、うつ病をはじめとした精神疾患や、糖尿病や喘息などうつ病に高い割合で併発するとされる身体疾患の発症に関与している可能性があることを示してきた。NLRP3 は血糖やアレルギーなどの物理的な物質を感知するのみならず、心理的ストレスをも感知すると想定されるが、その詳細なメカニズムは分かっていない。申請者らはこれまで NLRP3 ノックアウトマウスを用いストレスに対する行動学的評価を行ったところ、著明な抗不安作用、抗うつ作用を認めた。

今回はうつ病を引き起こす様々な危険物質を検出する NLRP3 インフラマソームがストレスにより実際に変化するのか、また NLRP3 を制御することでうつ病の発症を予防することができるか検討するため、心理的ストレスを負荷した際の NLRP3 の活性化を共免疫沈降-ウエスタンブロット法により検討した。



(4) また IL-1 β の産生・放出にはこの NLRP3 が律速段階になっていることが知られる。最近、 β -hydroxybutyrate(BHB)が NLRP3

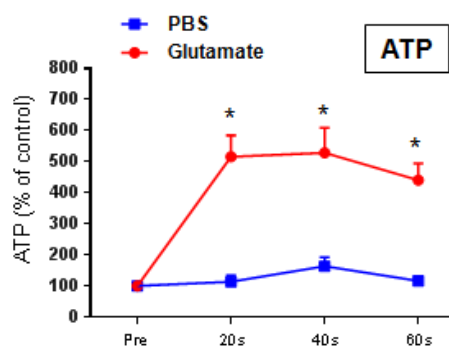
を特異的に阻害することが示され(Youm et al. 2015)、また BHB はある条件下で体内においても存在する物質で安全であることから、BHB を用いて NLRP3 の活性化を抑制することで抗うつ効果が得られるか検証した。

【Co-immunoprecipitation western blotting を用いたタンパク複合体の同定】 NLRP3 は新たに産生されるタンパクと、既に存在するタンパクがインフラマソームを形成する、2 段階を経て活性化される。ストレスによって産生される ATP が作用しているのは 2 段階目のインフラマソームの形成である。この産生量を計測するためには通常の western blotting では不可能であり、共免疫沈降を行って採取した検体から NLRP3 を測定した。

【行動実験】 動物は Chronic unpredictable mild stress を用いてうつ病様の行動を誘発した。上記の試薬を用いてその行動を Open field test、Elevated plus maze test、Forced swim test、Sucrose preference test、Novelty suppressed feeding test などによりその効果を判定した。

4 . 研究成果

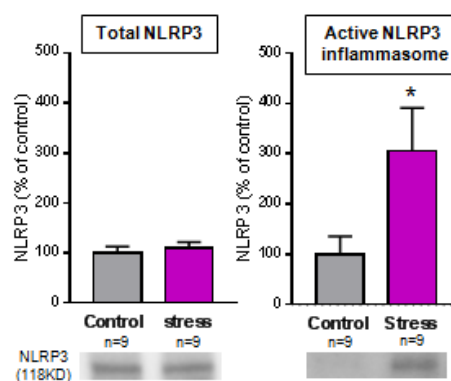
(1) 初代アストロサイト培養細胞においてグルタミン酸を投与すると ATP が急速に上昇することが明らかになった。この変化は 20 秒以内に現れ、その変化量は基礎値に対して 5 倍以上となることが分かった。



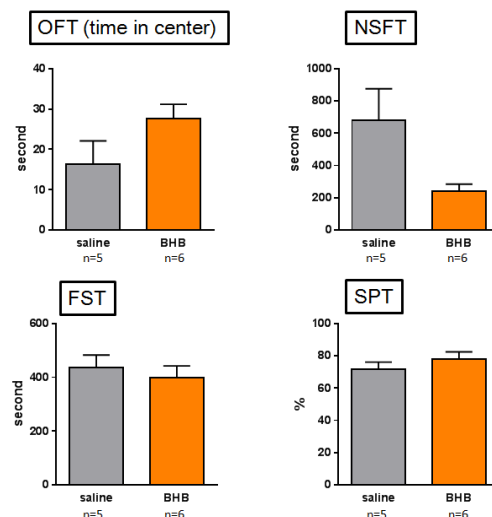
(2) リルゾールを投与すると、末梢コルチゾール値の上昇が抑えられた。現段階では

その差はわずかであり、今後更なる検討が必要である。しかしながら、リルゾールによる抗うつ作用は、グルタミン酸抑制、およびその後の炎症カスケードの抑制によることが予想された。

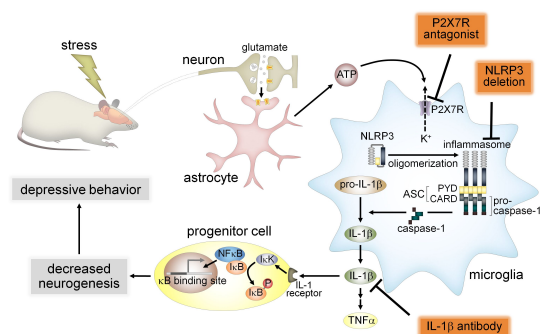
(3) ストレスにより NLRP3 は有意に活性化されることが分かった。この変化は NLRP3 の活性化のみに現れており、NLRP3 のタンパク量自体の変化は認められなかった。すなわち心理的ストレスは NLRP3 の活性化に対して primary に関与していることが想定された。



(4) そこで NLRP3 の活性化抑制剤である Beta-Hydroxybutyrate (BHB) を投与すると、コントロール群に比べて有意にうつ病様の不安行動指標を低下させた。これらのことから、ストレスを介した脳内炎症とうつ病様行動変化の改善に BHB などの NLRP3 活性化阻害剤が有用であると考えられた。



(5) これらの結果および我々のこれまでの知見により、(i) ストレスが脳内で過剰なグルタミン酸を放出させること、また(ii) それに引き続く ATP の誘導を介して(iii) NLRP3 (細胞内受容体) が活性化されることで炎症性サイトカイン (interleukin-1 β 等) が脳内で産生され(脳内炎症)、(iv) 神経新生の抑制を生じる結果(v) うつ状態を引き起こす、ことが明らかになった。今後は図に示すような、ストレス-炎症系経路を制御することでうつ病を予防する新たな治療法の開発に望む。



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)

岩田正明、ミクログリアとストレス、分子精神医学、14巻、2014、11-18(査読無)

[学会発表](計2件)

T. Yamanashi, M. Kusunose, T. Yamauchi, K.T. Ota, M. Iwata, R.S. Duman, K. Kaneko. Glutamates stimulate astrocyte release of ATP: a potential mechanism for reluzole's antidepressant action. Neuroscience 2014. 2014年11月15日~11月19日、Washington D.C.

岩田正明、山梨豪彦、楠瀬未菜、山内崇平、三浦明彦、兼子幸一。ストレス誘発性グルタミン酸放出の抑制がリルゾールの持

つ抗うつメカニズムである可能性。日本生物学的精神医学会、2014年9月29日~10月1日、奈良県文化会館(奈良県奈良市)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

岩田 正明 (Iwata, Masaaki)

鳥取大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：40346367